

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Marburg

ÜBER DIE EIGNUNG DER SPEKTRALANALYSE
ZUR BESTIMMUNG DES BLUTFLECKENALTERS
IN DER RECHTSMEDIZINISCHEN PRAXIS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der

Philipps-Universität zu Marburg

vorgelegt von —

UWE KÖHLER

aus Lohfelden

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus dem Institut für Rechtsmedizin der
Universität Marburg

ÜBER DIE EIGNUNG DER SPEKTRALANALYSE
ZUR BESTIMMUNG DES BLUTFLECKENALTERS
IN DER RECHTSMEDIZINISCHEN PRAXIS

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

UWE KÖHLER

aus Lohfelden

Marburg 1976

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Universität Marburg am 20. 2. 1976
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. I. Oepen

Correferent: Prof. Dr. med. F. Schleyer

Meinen Eltern

Inhalt

A. Einleitung	5
1. Das Verfahren von KIND	6
2. Das Verfahren von KLEIHAUER	7
B. Eigene Untersuchungen	
1. Material und Methode	
1.1. Spektrophotometer.	9
1.2. Blutflecken.	9
2. Methode nach KIND	
2.1. Vorversuche.	11
2.1.1. Elutionsmittel.	14
2.1.2. Trägermaterial.	15
2.1.3. Bestimmung der optimalen Proben- größe	16
2.2. Hauptversuche.	16
2.2.1. Blutkonzentrationsänderungen im Eluat	17
2.2.2. Vergleich zwischen Nativ- und Citratblut.	20
2.2.3. Einfluß des Trägermaterials	22
2.2.4. Blutaltersbestimmung an allen untersuchten Blutproben	23
2.2.5. Blutaltersbestimmung einzelner Blutproben.	29
3. Methode nach KLEIHAUER	
3.1. Vorversuche	
3.1.1. Elutionsmittel.	32

3.1.2. Trägermaterial.	32
3.1.3. Ermittlung des geeigneten Verfahrens.	32
3.2. Hauptversuche.	39
3.2.1. Blutkonzentrationsänderungen im Eluat	39
3.2.2. Vergleich zwischen Nativ- und Citratblut.	48
3.2.3. Einfluß des Trägermaterials	51
3.2.4. Blutaltersbestimmung an allen untersuchten Blutproben	54
3.2.5. Blutaltersbestimmung einzelner Blutproben.	62
C. Besprechung und Vergleich beider Methoden. . . .	65
D. Zusammenfassung.	68
E. Literatur.	69

A. Einleitung

Anlaß für diese Untersuchung waren Veröffentlichungen von KIND und WATSON und von KLEIHAUER und Mitarbeitern¹⁾ über Möglichkeiten zur Bestimmung des Blutalters in Blutflecken mit dem Spektrophotometer. Diese beiden Methoden sollten auf ihre Eignung für die rechtsmedizinische Praxis geprüft und gegebenenfalls modifiziert oder kombiniert werden.

Zwar gibt es ältere Methoden der Blutaltersbestimmung, so z.B. die von SCHWARZACHER angegebene Farbänderung der Blutspuren nach künstlicher Bestrahlung mit einer Quarzlampe oder die Bestimmung des Chloridsaumes nach WEINIG, befriedigende Ergebnisse lassen sich hiermit aber nicht erzielen. Die Umwelteinflüsse während des Alterungsprozesses haben nämlich bei diesen Techniken eine größere Bedeutung als der Zeitfaktor, wobei sich vor allem Wärme, Licht und Feuchtigkeit, aber auch Blutmenge, Beschaffenheit der Unterlage und andere Einflüsse auf die Ergebnisse auswirken. Dies veranlaßte sowohl KIND als auch KLEIHAUER, neue Verfahren zu erarbeiten, die beide darauf beruhen, die Alterungsprozesse von Blutflecken durch spektrophotometrisch gewonnene Kurven darzustellen. Die durch Eluieren erhaltenen Hämoglobinderivate ergeben bei verschiedenen Altersstufen unterschiedliche Kurvenprofile. Diese Unterschiede werden bei beiden Verfahren in Form eines Quotienten ausgedrückt, der aus den Extinktionswerten bei zwei Wellenlängen errechnet wird.

¹⁾ Im Folgenden als "KLEIHAUER" zitiert.

1. Das Verfahren von FIND

Nativblutflecken, die 25 mm² groß sind, werden in 0,6 ml einer 1% NH₄OH-Lösung eluiert. Von dem so erhaltenen Eluat wurde im sichtbaren Bereich von 450-660 nm im Spektrophotometer(Unicam SP 800) eine Extinktions- (Absorptions-) Kurve aufgenommen. Bei 500, 560, 578 und 650 nm wurden Lote gefällt. Die Schnittpunkte der Kurve mit dem Lot bei 500 und 650 nm wurden durch eine Gerade miteinander verbunden. Die die Alterung kennzeichnende " α_B -ratio" wurde dann folgendermaßen definiert (unverändert zitiert) :

$$\alpha_B = \frac{A_{ac} - A_{bc}}{A_{df} - A_{ef}}$$

wobei "A" Absorption bedeutet, gemessen an den beiden Loten bei 560 nm und bei 578 nm (Abb. 1).

Diese Art der Auswertung entspricht weitgehend einem von FIND früher angegebenen Verfahren. Dazu wurden die Spektrophotometerkurven statt von Bluteluaten von getrockneten Blutflecken, die in Paraffin eingebracht waren, aufgezeichnet. Mit zunehmendem Alter des Blutfleckens nahm die Intensität (und damit die Höhe des Kurvenmaximums) bei 578 nm ab. Außerdem verschob sich das Maximum zu kürzeren Wellenlängen. Daraus folgte eine entsprechende Abnahme des Quotienten. Der Grund für die Veränderungen der Kurve ist der zunehmende Übergang von

Oxyhämoglobin zu Methämoglobin (Hämoglobin) im Verlauf des Alterns. Ähnliche Veränderungen zeigten sich auch bei dem neuen von KIND angegebenen Verfahren.

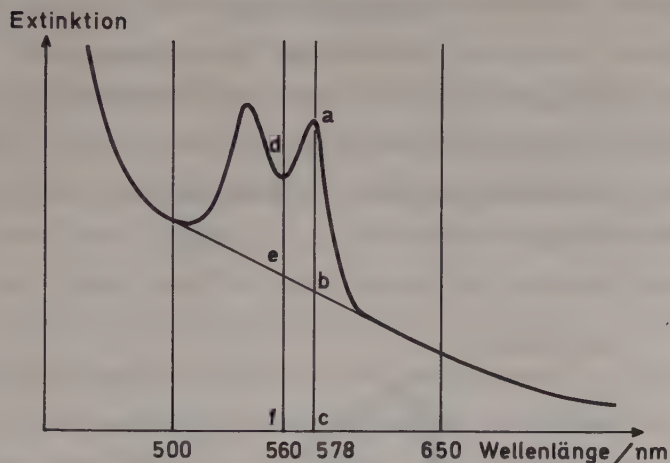


Abb. 1. Methode zur Berechnung der " α_B -ratio"

2. Das Verfahren von KLEIHAUER

Blutflecken, die von 0,1 ml Citratblut angelegt wurden, wurden in 5 ml Transformationslösung (200 mg KCN und 200 mg K_3FeCN_6 ad 1000 ml Aqua dest.) 2 Stunden eluiert. 3 ml dieses Eluates wurden dann mit weiteren 3 ml Transformationslösung versetzt. Anschließend wurde 4 min mit Tetrachlorkohlenstoff ausgeschüttelt und dann bei 6000 Upm 10 min zentrifugiert. Von den so erhaltenen Cyanmethämoglobin-

lösungen wurden nach fünffacher Verdünnung mit Transformationslösung im Zeiss-Spektralphotometer Extinktionskurven gezeichnet mit einem Maximum bei 540 nm und einem Minimum bei 500 nm. KLEIHAUER beobachtete, daß sich mit zunehmendem Alter die Höhe des Maximums bei 540 nm nicht veränderte, während bei den übrigen Wellenlängen bei höherem Alter größere Extinktionswerte auftraten (Abb. 2). Es wurde der Quotient aus den Extinktionswerten bei 540 und 500 nm gebildet, der sich mit zunehmendem Alter entsprechend verkleinerte.

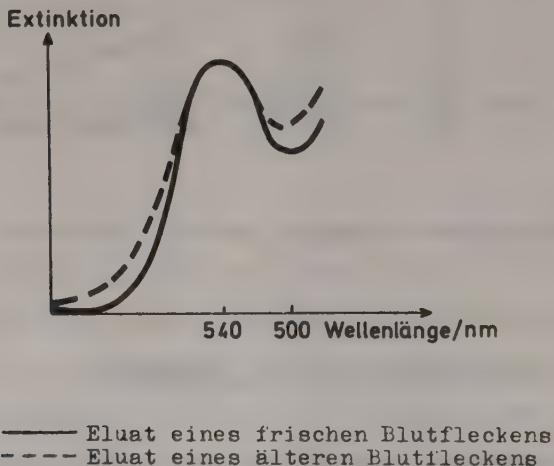


Abb. 2. Veränderungen der Extinktionswerte bei der Blutalterung

B. Eigene Untersuchungen

1. Material und Methode

1.1. Spektrophotometer

Die Spektralanalysen wurden mit einem Beckman-Spektrophotometer Modell DB vorgenommen, an das der zugehörige Beckman-Laborschreiber angeschlossen war; sein Papiervorschub betrug 25,4 mm/min. Damit stimmte die Geschwindigkeit der Wellenlängenänderung des Spektrophotometers mit der Papiertransportgeschwindigkeit des Schreibers überein. Da der Schreiber die Transmissionswerte und nicht die Extinktionswerte linear aufzeichnete, wurden bei den späteren Berechnungen bei der Methode nach KLEIHAUER die Transmissionswerte in Extinktionswerte umgerechnet (bei der Methode nach KIND ist das nicht möglich, was später erläutert wird).

In 10 mm Quarzküvetten mit einem Inhalt von 1,5 ml wurde jeweils das Eluat gegen das entsprechende als Leerwert dienende Lösungsmittel gemessen.

1.2. Blutflecken

Es wurden zwei Serien von Blutflecken untersucht. Die erste Serie bestand aus älteren Flecken aus den Jahren 1969 bis 1973, die bei früheren Untersuchungen hergestellt

und längere Zeit in einem Schrank bei Lichtabschluß aufbewahrt worden waren. Bei 9 dieser Proben waren neben den Nativoluten noch Citratblute desselben Spenders vorhanden. Die zweite Serie aus den Jahren 1974 und 1975 enthielt Blutflecken, die im Verlauf der Untersuchungen frisch hergestellt worden waren. Sie lagen während der Zeit der Versuche auf einem Laboratoriumstisch und waren den normalen Lichtschwankungen ausgesetzt.

Um kleine Proben gleicher Größe aus den Blutflecken zu erhalten, wurde Millimeterpapier auf eine stabile Plastikfolie aufgezogen und diese in der gewünschten Größe ausgeschnitten. Die Folienstückchen wurden dann mit Hilfe von Stecknadeln auf dem Blutflecken und einer darunterliegenden Korkplatte festgesteckt und mit einer scharfen Rasierklinge Blutflecken von der Größe der Folienmuster ausgeschnitten.

2. Methode nach KIND

2.1. Vorversuche

Die ersten Versuche mit der Methode nach KIND zeigten eine geringfügige Abweichung des Kurvenverlaufs gegenüber dem von KIND beschriebenen: die Maxima und Minima waren um 6 nm in den Bereich niedrigerer Wellenlängen verschoben. Das wurde bei den späteren Auswertungen berücksichtigt. Aus technischen Gründen wurde im Gegensatz zu KIND die Kurve so aufgezeichnet, daß die bei hohen Wellenlängen gemessenen Werte links und die bei niedrigen Wellenlängen gewonnenen rechts dargestellt sind (eine für die Methode typische Kurve zeigt Abb. 3).

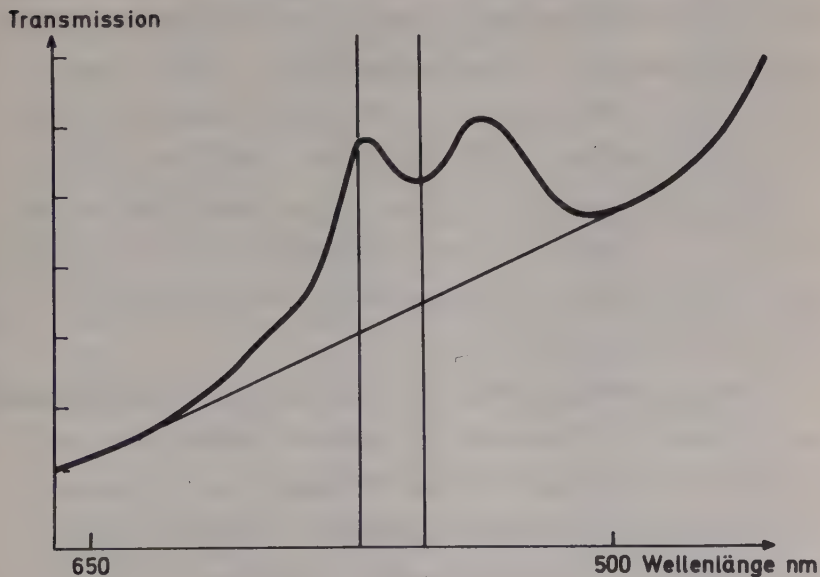


Abb. 3. Eine der für die Methode nach KIND typischen Kurven

Da das Beckman-Spektrophotometer Modell DB mit dem zugehörigen Schreiber nicht die Extinktionswerte, sondern die Transmissionswerte linear aufzeichnet, können diese Kurven nicht unmittelbar mit der von KIND angewendeten Methode zur Berechnung der α_s -ratio verglichen werden. Das folgt aus der Beziehung zwischen Extinktion (E) und Transmission (T), die aus folgender Gleichung hervorgeht: $E = -\log T$, wobei $T = I/I_0$ ist.

Eine Logarithmierung der Transmissionswerte würde keine Lösung bieten, da KIND eine Hilfsgerade zwischen 500 und 650 nm konstruiert und bei Logarithmierung nur die Punkte auf der Kurve, nicht aber die auf der Hilfsgeraden (die ja bei logarithmischer Kurvenform an anderer Stelle liegen) einen entsprechenden Wert erhielten. Die einzige Möglichkeit, die beiden Kurvenformen zu vergleichen wäre, die Transmissionskurve in den entscheidenden Punkten nach Umrechnung in logarithmische Werte in eine lineare Extinktionskurve umzukonstruieren, wobei allerdings durch Ungenauigkeiten bei Konstruktion und Ablesen weitere Fehlermöglichkeiten hinzukommen können. Aus diesem Grund wurde eine Blutprobe in mehreren Verdünnungsstufen untersucht und nach den verschiedenen Möglichkeiten die α_s -ratio berechnet (Tab. 1).

Wie zu erwarten, sind die Abweichungen (A) vom Mittelwert, sowie die Differenz (D) zwischen niedrigstem und höchstem Wert bezogen auf den Mittelwert der α_s -ratio bei der nicht ganz korrekten Methode, sämtliche Transmissionswerte zu logarithmieren, am größten. Bei dem

Vergleich der Transmissionswerte mit den (konstruierten) Extinktionswerten zeigt sich, daß Abweichungen und Differenz bezogen auf den Mittelwert bei der Berechnung des Quotienten aus den Transmissionswerten günstiger liegen. Aus diesem Grund (und um mit dem vorhandenen Gerät weiterarbeiten zu können), wurde bei den weiteren Versuchen eine der KIND'schen entsprechende Methode verwendet, bei der aber statt der Extinktionswerte die Transmissionswerte zugrunde gelegt wurden.

Tab. 1. Berechnung der α_s -ratio nach verschiedenen Verfahren.
Technik nach KIND

Transmissionswerte		Transmissionswerte logarithmiert		Extinktionswerte konstruiert	
Q	A	Q	A	Q	A
1,34	0,17	1,218	0,387	1,356	0,376
1,34	0,17	1,230	0,375	1,354	0,378
1,38	0,13	1,487	0,118	1,614	0,118
1,48	0,03	1,741	0,136	1,891	0,159
1,73	0,22	2,009	0,404	2,116	0,384
1,79	0,28	1,946	0,341	2,062	0,330
$\bar{Q}$	1,51	1,605		1,732	
$\bar{A}$	0,167	0,2935		0,2908	
$\bar{A}\%$	11,06	18,28		16,79	
$\bar{D}$	0,45	0,791		0,762	
$\bar{D}\%$	29,80	49,28		43,99	

2.1.1. Elutionsmittel

KIND (1973) gibt in der vorliegenden Arbeit als Elutionsmittel eine 1% NH_4OH -Lösung an. In einer früheren Arbeit (1969) hat er zur Blutgruppenbestimmung eine 5% NH_4OH -Lösung zur Elution verwendet. SCHLEYER gibt eine 0,04% NH_4OH -Lösung als geeignet an. Aus diesem Grund wurden verschiedene Blutproben unterschiedlichen Alters in folgenden NH_4OH -Konzentrationen eluiert: 5% , 1% , 0,1% , 0,04% . Hierbei zeigte sich, daß zwar die beste Elution mit der höchsten NH_4OH -Konzentration zu erreichen ist, daß aber bei den älteren (über 4 Jahre alten) Blutflecken auch nach wesentlich verlängerter Elutionsdauer von fast 6 Tagen (143 Stunden) und abschließender Inkubation im Wärmeschrank bei 37°C keine befriedigenden Ergebnisse zu erreichen sind. Mit abnehmender NH_4OH -Konzentration verschlechtert sich die Extraktion des Blutes aus dem Stoff, aber die Amplitudenschwankungen der Kurve (d.h. die Differenz Maxima/Minima) werden deutlicher. Es wurden deshalb drei weitere Blutproben unterschiedlichen Alters untersucht nach Lösung in: 0,1% und 0,04% NH_4OH sowie in Aqua dest. . Mit abnehmender Konzentration wird das Kurvenprofil immer deutlicher und der Wert des Quotienten nimmt entsprechend zu (Tab. 2).

Tab. 2. Vergleich der Quotienten bei verschiedenen NH_4OH -Konzentrationen und Aqua dest. als Lösungsmittel. Technik nach KIND

Probe	0,1%	0,04%	A.d.
1	1,19	1,23	1,41
2	1,23	1,29	1,35
3	1,27	1,33	1,55

Da sich mit abnehmender Konzentration der Extraktionslösung die Eluierfähigkeit vermindert und damit bei Aqua dest. am schlechtesten ist, wurde bei allen weiteren Versuchen mit der 0,04% NH_4OH -Lösung gearbeitet. So ließ sich bei noch genügender Elution ein deutliches Kurvenprofil gewinnen.

2.1.2. Trägermaterial

Eine 25 mm^2 große Stoffprobe aus Baumwolle wurde eluiert. In dem für die Berechnungen entscheidenden Bereich von 650 bis 500 nm war keine Extinktion feststellbar. Das bedeutet, daß der Stoff keine Eigenreaktion aufweist und daher als Träger von Blutspuren die Befunde im obengenannten Meßbereich nicht beeinflusst.

2.1.3. Bestimmung der optimalen Probengröße

Von einem 41 Tage alten Blutfleck wurden die Probengrößen $0,25 \text{ cm}^2$, $0,5 \text{ cm}^2$, $1,0 \text{ cm}^2$ untersucht. Bei weiteren Versuchen mit jahrealten und frischen Blutproben zeigte sich eine Probengröße von $0,25 \text{ cm}^2$ als günstig. Bei älteren Blutflecken wäre eine größere Probe zwar angebracht, um mehr Blut eluieren zu können, aber bei frischen und wenige Tage alten Flecken erweisen sich $0,5 \text{ cm}^2$ als zu groß. Es wird dann zuviel Blut eluiert, so daß das Spektrophotometer wegen der entsprechend großen Absorption ($\hat{=}$ Extinktion) keine deutlich ausgeprägte Kurve mehr zeichnen kann. Deshalb wurde in allen weiteren Versuchen mit der auch von KIND angegebenen Probengröße von $0,25 \text{ cm}^2 = 25 \text{ mm}^2$ gearbeitet.

2.2. Hauptversuche

Die Proben wurden in verschlossenen Coombs-Röhrchen in $1,55 \text{ ml}$ Lösungsmittel eluiert. (Dabei wird ein Verlust von $0,05 \text{ ml}$ durch Adhäsion im Röhrchen angenommen, so daß $1,5 \text{ ml}$ Lösung zur Verfügung stehen.) Die Proben wurden über Nacht mindestens 15 Stunden zum Eluieren stehengelassen. Die mehr als 2 Jahre alten Proben wurden anschließend für 3 Stunden im Wärmeschrank inkubiert.

2.2.1. Blutkonzentrationsänderungen im Eluat

2.2.1.1. Bei Doppelbestimmungen

Um zu kontrollieren, in welchen Grenzen der Quotient bei Doppelbestimmungen desselben Blutfleckens schwankt, wurden bei 15 Blutproben im Alter von 0-9 Tagen die Quotienten von jeweils zwei 25 mm² großen Proben desselben Blutfleckens gemessen (insgesamt 122 Bestimmungen).
(Tab. 3 und Abb. 4)

Tab. 3. Mittlere Differenz der Quotienten bei Doppelbestimmungen an Blutflecken verschiedenen Alters. Technik nach KIND

Alter	$\bar{Q}$	$\bar{D}$	$\bar{D}\%$
0	1,709	0,020	1,17
1	1,687	0,022	1,30
2	1,636	0,025	1,53
3	1,621	0,042	2,59
4	1,601	0,025	1,56
5	1,593	0,042	2,64
6	1,595	0,014	0,88
7	1,543	0,038	2,46
9	1,539	0,046	2,99

Der Mittelwert des Quotienten zeigt eine mit zunehmendem Alter deutlich abnehmende Tendenz. Die Differenz der für einen Blutfleck gemessenen zwei Werte zeigt aber große Schwankungen und liegt im Mittel bei 1,9%. Bestimmt man die mittlere Abnahme des Quotienten $\bar{Q}$ pro Tag und

ebenfalls den Mittelwert der Differenz $\bar{D}$, so wird deutlich, daß die durchschnittliche tägliche Abnahme des Quotienten $\bar{Q}$ von 0,024 (die Werte der 9 Tage alten Proben müssen hierfür entfallen, da sie 2 Tage älter sind als die vorausgehenden) geringer ist als die durchschnittliche Differenz $\bar{D}$ zweier gemessener Werte von 0,029!

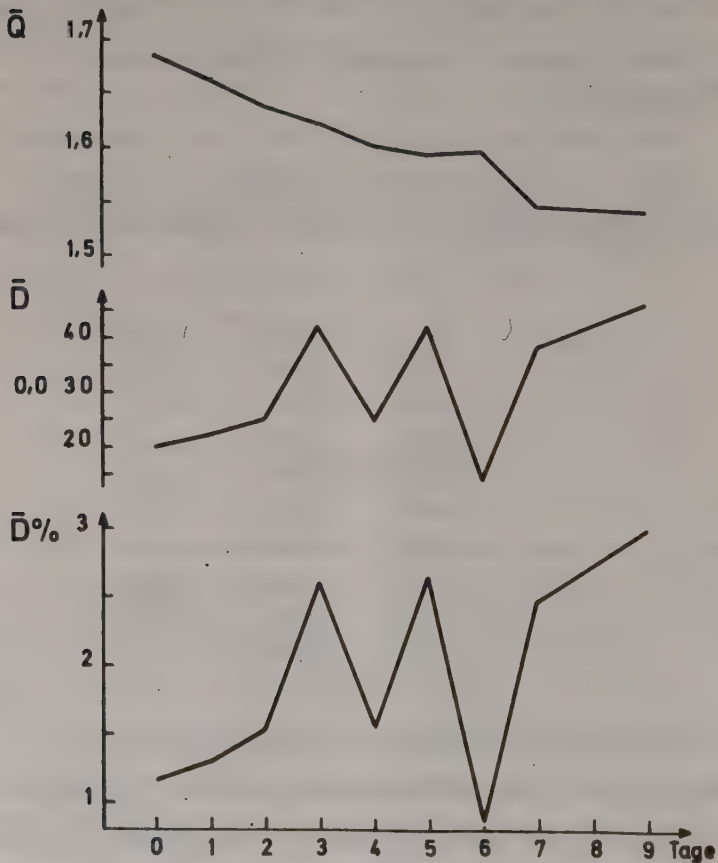


Abb. 4. Differenz der Quotienten bei Doppelbestimmungen (siehe Tab. 3). Technik nach KIND

Eine sichere altersspezifische Zuordnung der Quotienten ist also nicht möglich. Da diese Schwankungen des Quotienten durch die unterschiedliche Konzentration der Eluate verursacht wird, bedeutet das, daß schon die bei Blutspuren unvermeidlichen Blutkonzentrationsunterschiede pro Flächeneinheit des Trägermaterials bei demselben Blutfleck eine genaue Altersbestimmung unmöglich machen!

2.2.1.2. Bei Änderung der Probengröße und des Verdünnungsgrades

Bereits in den Vorversuchen wurde auf Konzentrationschwankungen durch Verändern der Fleckengröße oder des Verdünnungsgrades hingewiesen. Mit abnehmender Konzentration steigt der aus den Transmissionswerten berechnete Quotient α_g . Zugleich ändert sich auch die Steigung der zwischen 650 und 500 nm konstruierten Hilfsgeraden. Mit abnehmender Konzentration nimmt auch die Steigung der Geraden ab.

Weiterhin ist festzustellen, daß das Spektrophotometer bei hohen und niedrigen Konzentrationen (jenseits von 10 oder 80% Transmission) kein deutlich ausgeprägtes Kurvenprofil mehr zeichnet, d.h. die Amplitudenschwankungen sind zu gering, und damit ist die Fehlerbreite bei der Berechnung des Quotienten vergrößert. Deshalb ist der Transmissionsbereich zwischen 10 und 80% der geeignetste.

2.2.2. Vergleich zwischen Nativ- und Citratblut

Es wurden auch Citratblutproben mit Nativblutproben desselben Spenders verglichen, denn KLEIHAUER verwendete in seiner Arbeit im Gegensatz zu KIND Citratblut, das aber in der rechtsmedizinischen Praxis nicht vorkommt. Mit Ausnahme einer Blutprobe war, auch bei unterschiedlichen Konzentrationen des Elutionsmittels, die Konzentration des Eluates bei Nativblut größer als bei Citratblut. Das liegt daran, daß die Blutmenge pro Flächeneinheit des Trägermaterials bei Nativblut größer ist als bei Citratblut. Citratblut kann sich nämlich durch die eingeschränkte Gerinnung auf einem größeren Trägerareal ausbreiten als das schnell gerinnende Nativblut. Schon beim Betrachten der blutgetränkten Stofflappen lassen sich die Konzentrationsunterschiede erkennen: die Nativblutflecken zeigen eine dunklere Farbe als die gleichalten Citratblutflecken vom gleichen Spender.

Der Prozess der Blutalterung einer Citratblutprobe, dargestellt anhand des Quotienten α_B , wurde verglichen mit den Quotienten der in gleicher Serie, d.h. zum selben Zeitpunkt hergestellten Nativblutproben. Es sind keine nennenswerten Unterschiede festzustellen. Die auftretenden Differenzen sind wohl auf die oben beschriebenen Konzentrationschwankungen zurückzuführen (Tab. 4 und Abb. 5).

Tab. 4. Vergleich der Alterung von Nativ- und Citratblut.
Technik nach KIND

Alter	0	1	2	4	8 Tage
citrat	1,760	1,710	1,665	1,600	1,570
nativ	1,718	1,687	1,632	1,602	1,578

Alter	12	15	22	29	36 Tage
citrat	1,510	1,430	1,360	1,160	1,030
nativ	1,536	1,450	1,408	1,290	0,942

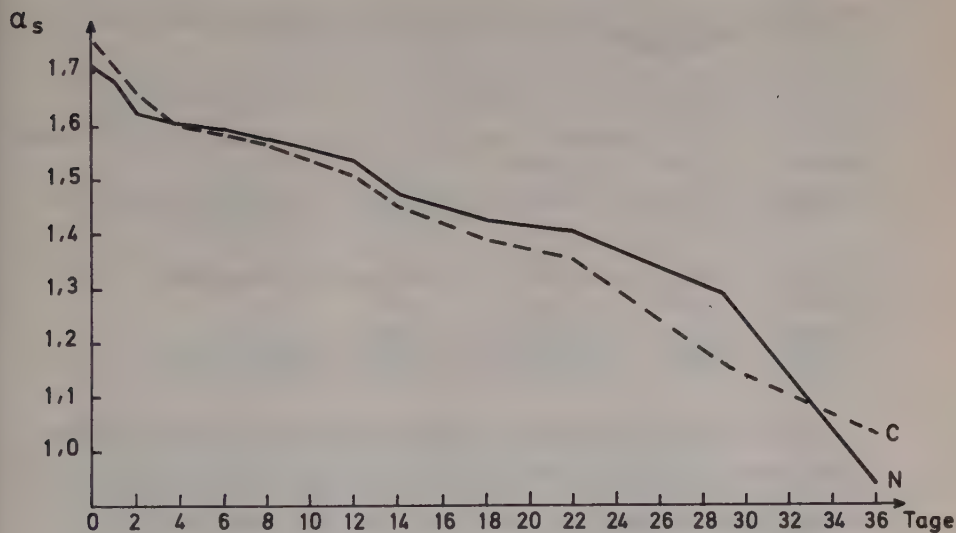


Abb. 5. Vergleich der Alterung von Nativ- und Citratblut.
Technik nach KIND

2.2.3. Einfluß des Trägermaterials

Die Blutprobe eines Spenders wurde sowohl auf (auch bei den übrigen Versuchen verwendeten) Baumwollstoff als auch auf Fließpapier aufgebracht und der Alterungsprozeß anhand des Quotienten α_g vom Herstellungstag des Blutfleckens bis zu einem Alter von 34 Tagen untersucht (Tab. 5 und Abb. 6).

Tab. 5. Vergleich der Quotienten bei unterschiedlichem Trägermaterial. Technik nach KIND

Alter	0	2	4	6	10 Tage
Stoff	1,67	1,645	1,61	1,63	1,56
Papier	1,595	1,585	1,56	1,58	1,59

Alter	13	20	27	34 Tage
Stoff	1,48	1,43	1,43	1,17
Papier	1,46	1,43	1,39	0,96

Es sind keine wesentlichen Unterschiede festzustellen. Die etwas geringeren Werte des Quotienten des Papiereluates haben ihre Ursache in der stärkeren Konzentration des Eluates. Da die Saugfähigkeit des Papiers größer ist, ergibt sich daraus eine höhere Blutkonzentration pro Flächeneinheit des Trägermaterials und somit auch eine höhere Konzentration des Eluates. Wie bereits in Abschnitt 2.2.1.2. gesagt, nimmt aber mit steigender Konzentration des Eluates der Wert des Quotienten ab und umgekehrt (vgl. hierzu auch Tab. 1).

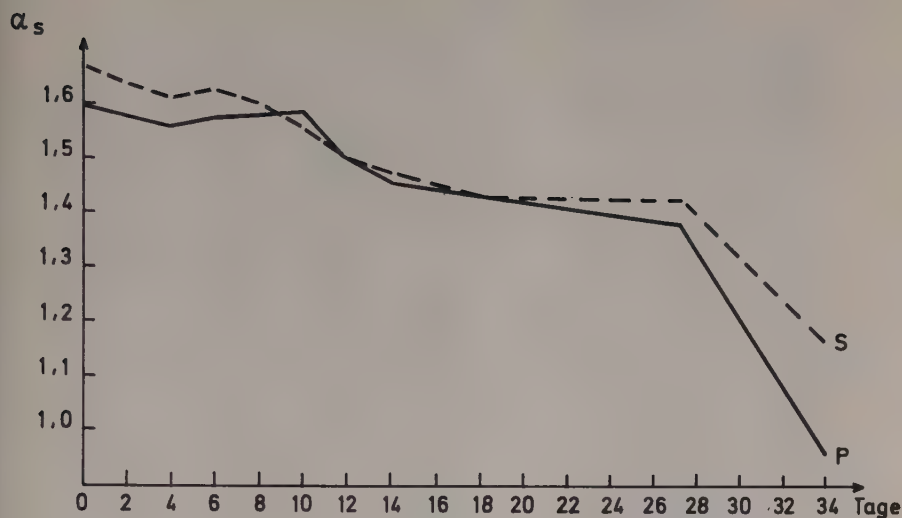


Abb. 6. Vergleich der Quotienten bei unterschiedlichem Trägermaterial (vgl. Tab. 5). Technik nach KIND

2.2.4. Blutaltersbestimmung an allen untersuchten Blutproben

Zur Bestimmung des Blutalters wurden sowohl die frisch angelegten Serien von Blutflecken als auch die von früheren Versuchen noch vorhandenen älteren Blutflecken verwendet. Tabelle 6 und Abbildung 7 zeigen die für die verschiedenen Altersstufen gemessenen Quotientenwerte.

Tab. 6. Quotienten aller zur Blutaltersbestimmung
untersuchten Blutproben (Alter in Tagen).
Technik nach FIND

Alter	0	1	2	3	4	5
Probe						
51				1,63	1,535	1,555
52				1,615	1,60	1,56
53				1,59	1,53	1,56
54				1,63	1,64	1,645
55				1,64	1,695	1,645
56	1,72	1,66	1,62		1,57	
57	1,70	1,68	1,69		1,61	
59	1,715	1,715	1,685		1,625	
60	1,735	1,71	1,605		1,625	
61	1,72	1,67	1,56		1,58	
62	1,78		1,64		1,61	
63	1,665		1,655		1,64	
64	1,67		1,645		1,61	
65	1,745		1,635		1,66	
66	1,64		1,63		1,60	
67	1,75				1,55	
	1,713	1,687	1,637	1,621	1,605	1,593

Alter	13	14	15	17	20	21
51	1,46			1,46	1,41	
52	1,52			1,49	1,45	
53	1,58			1,49	1,42	
54	1,59			1,53	1,42	
55	1,53			1,51	1,36	
56			1,42			
57			1,47			
59			1,46			
60			1,46			
61			1,44			
62	1,47				1,43	
63	1,49				1,42	
64	1,48				1,43	
65	1,48				1,39	
66	1,45				1,44	
67		1,48				1,40
	1,505	1,48	1,45	1,496	1,417	1,40

	6	7	8	9	10	11	12
51	1,55	1,42		1,46		1,53	
52	1,59	1,55		1,535		1,57	
53	1,59	1,595		1,57		1,56	
54	1,595	1,60		1,555		1,61	
55	1,65	1,55		1,575		1,52	
56	1,60		1,57				1,55
57	1,63		1,59				1,53
59	1,59		1,57				1,54
60	1,60		1,59				1,54
61	1,68		1,57				1,52
62	1,60				1,58		
63	1,60				1,60		
64	1,63				1,56		
65	1,62				1,55		
66	1,61				1,62		
67		1,53					
	1,609	1,541	1,578	1,539	1,582	1,558	1,536

	22	27	28	29	34	36	41
51		1,33			1,30		1,18
52		1,40			1,32		1,18
53		1,42			1,36		1,22
54		1,35			1,37		0,97
55		1,40			1,31		1,14
56	1,35			1,23		1,00	
57	1,40			1,31		1,00	
59	1,38			1,17		0,99	
60	1,49			1,38		0,83	
61	1,42			1,36		0,89	
62		1,29			1,04		
63		1,38			1,10		
64		1,43			1,17		
65		1,33			1,23		
66		1,25			1,24		
			1,22				
	1,408	1,358	1,22	1,29	1,244	0,942	1,138

Tab. 6. Teil II. Quotienten verschiedener älterer Proben
(Alter in Tagen). Technik nach KIND

Alter	87	185	300	335	1077
	1,25	1,21	1,18	1,23	1,00
	1,29	1,32	1,03	-	0,93
	<u>1,25</u>	<u>1,23</u>	-	-	
	1,263	1,253	1,105	1,23	0,965
Alter	1078	1573	1676	1706	
	0,78	-	-	-	
			-	-	
	<u>0,78</u>	-	-	-	

- = nicht meßbar

Das in der Tabelle 6 in Tagen angegebene Blutalter wurde in der Zeichnung (Abb. 7) aus Gründen der Übersichtlichkeit zu größeren Zeiträumen zusammengefaßt und logarithmisch dargestellt. Als Zeiteinheit wurde 1 Monat verwendet, wobei die weniger als 1 Monat alten Proben in Wochen, die weniger als 1 Woche alten Proben im Intervall von Tagen dargestellt wurden. Zu jedem pro Zeitraum gemessenen Mittelwert wurde der jeweils höchste und niedrigste zugehörige Einzelwert angegeben. Auf die Bestimmung statistischer Werte wie durchschnittliche Abweichung, Varianz, Standardabweichung u.a. wurde verzichtet. Das wäre höchstens theoretisch interessant; für die rechtsmedizinische Praxis ist nur die absolute Schwankungsbreite der Befunde von Interesse, aus der hervorgeht, mit welcher Sicherheit eine Aussage -z.B. über das Alter einer Blutspur - gemacht werden kann. Hier kommt es

auf den einzelnen Wert an, der im Routinefall ohne Kenntnis der äußeren Einflüsse allein zur Verfügung steht. Eine Orientierung an den Mittelwerten der Abweichung könnte zur Fehlinterpretation eines Quotienten und damit zur Fehleinschätzung eines rechtsmedizinischen Falles bei einer Blutaltersbestimmung führen.

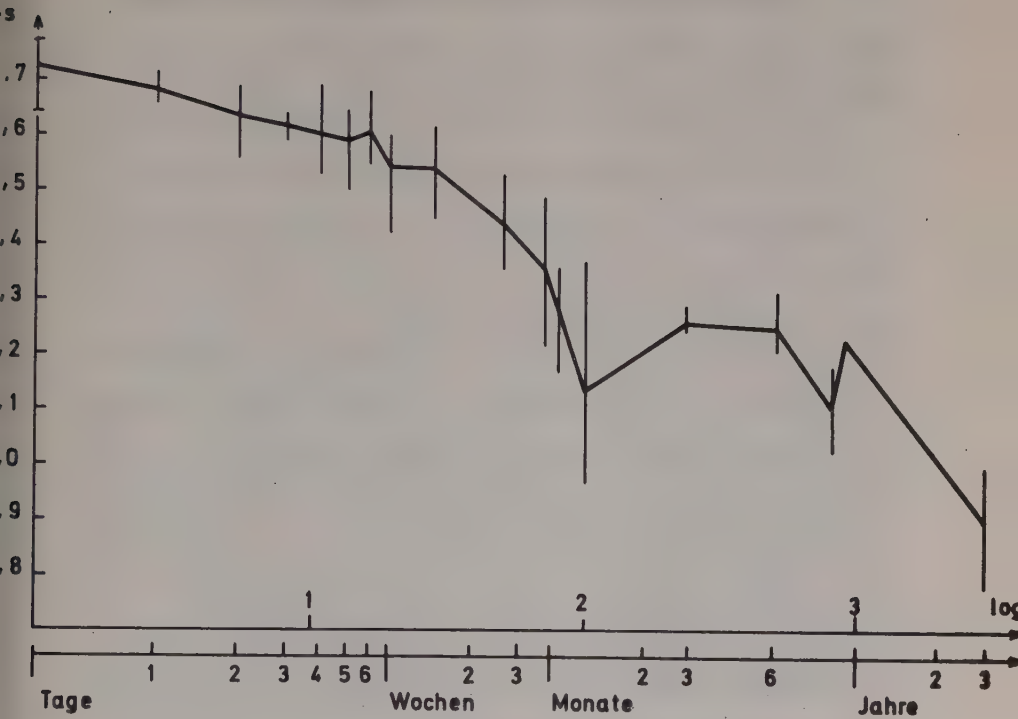


Abb. 7. Blutaltersbestimmung mit den Quotientenmittelwerten aller untersuchten Blutproben (siehe Tab. 6 Teil I und II). Technik nach KIND. Je Messpunkt sind auch die höchsten und niedrigsten Einzelmesswerte angegeben (senkrechte Linien).

Wie Abbildung 7 zeigt, ist eine abnehmende Tendenz der Quotienten im Laufe des Alterns zu erkennen, wobei bei den mehr als 1 Monat alten Proben im allgemeinen größere Schwankungen auftreten. Da die Abweichungen der einzelnen Messwerte einer Altersstufe vom entsprechenden Mittelwert größer sind als es die Abnahme des Quotientenwertes im Rahmen der Alterung ist, kann auf diese Weise keine sichere Alterszuordnung einer Blutprobe vorgenommen werden. Daß die mehr als 1 Monat alten Blutflecken keine eindeutigen Änderungen des Quotienten mehr zeigen und die Messung von jahrealten Proben praktisch nicht mehr möglich ist, liegt teilweise daran, daß die Elution mit zunehmendem Alter schlechter, d.h. die Konzentration des Eluates geringer wird und so die Kurven in den kritischen Bereich über 80% Transmission gelangen (vgl. Abschnitt 2.2.1.2.). Außerdem ist die Alterung ja gerade dadurch gekennzeichnet, daß die Differenz zwischen Maximum (578 nm) und Minimum (560 nm) abnimmt. Das bedeutet aber, daß schon geringe Ablesefehler zu größeren Änderungen des Quotienten führen. Auch eine Erhöhung der Konzentration des Eluates durch Verwendung eines konzentrierteren Extraktionsmittels ergibt gerade bei den älteren Blutproben keine entscheidend bessere Elution, wie bereits die Vorversuche zeigten. Außerdem wird, wie ebenfalls schon in den Vorversuchen dargestellt, bei steigender Konzentration des Eluiermittels das Kurvenprofil flacher (d.h. die Differenz Maximum/Minimum wird geringer), was seinerseits zu größeren Fehlern durch Ableseungenauigkeiten führt. Die Alterung

der Blutflecken ist also durch die abnehmende Tendenz der Quotienten unter den gegebenen Versuchsbedingungen nur bis zu einem Alter von etwa 1 Monat deutlich zu erkennen, eine sichere Altersbestimmung ist aber wegen der großen Schwankungsbreite auch in diesem Bereich nicht möglich.

2.2.5. Blutaltersbestimmung einzelner Blutproben

Um auch das Blutalter einzelner Proben im Verlauf der Alterung zu bestimmen, wurden die Quotienten von 16 der bereits in Tabelle 6. Teil I aufgeführten Blutflecken nach ihrer Herkunft aus bestimmten Blutproben geordnet und die altersbedingte Quotientenabnahme für jede einzelne Probe, sowie die Mittelwertkurve aller Messungen einer Altersstufe in Abbildung 8 dargestellt (zur besseren Übersicht wurden die Kurven nicht aufeinander sondern einzeln untereinander dargestellt). Wie KIND in seiner früheren Arbeit festgestellt hatte, zeigte sich, daß die Absolutwerte der Messungen der einzelnen Kurven stark differieren und so keine eindeutige Aussage zulassen, wenn auch die abnehmende Tendenz jeder einzelnen Probe im Verlauf der Alterung eine Beziehung zum Alterungsprozeß erkennen läßt.

In der rechtsmedizinischen Praxis steht aber eine Frischblutprobe des Spurenverursachers nicht zur Verfügung. Vielmehr soll der Spurenverursacher erst ermittelt werden. Es ist in der Regel auch nicht möglich,

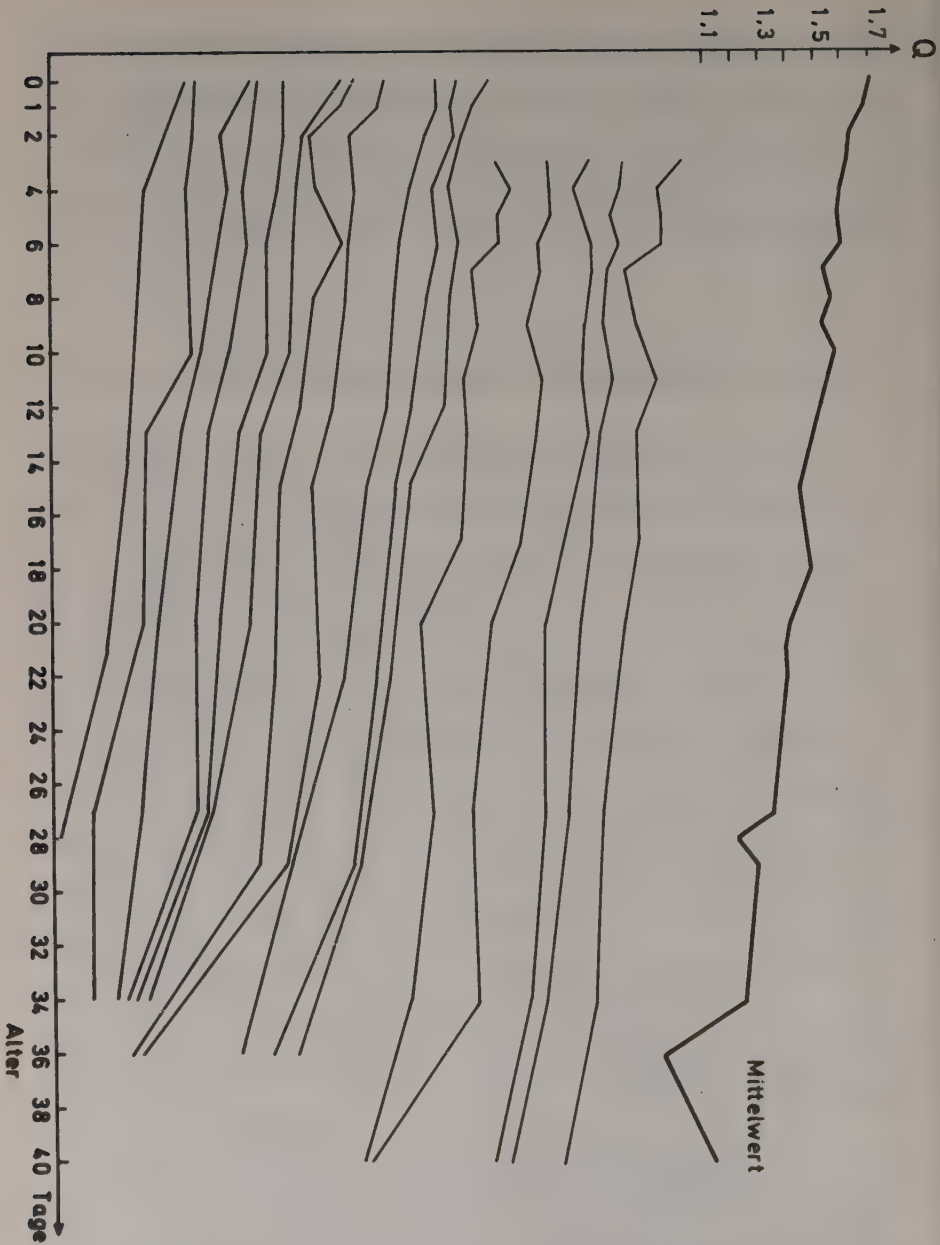


Abb. 8. Blutalter einzelner Blutproben (Erläuterungen siehe Text). Technik nachKIND

die zu untersuchende Bluts~~p~~ur weiter altern zu lassen,
um so ein eindeutiges Altersprofil der Kurven zu erkennen,
da für eine solche Untersuchung meistens weder das Material
noch die Zeit für diesen Arbeitsaufwand zur Verfügung
steht.

3. Methode nach KLEIHAUER

3.1. Vorversuche

3.1.1. Elutionsmittel

Die Elutionsflüssigkeit wurde nach den Angaben von KLEIHAUER hergestellt: 200 mg K_3FeCN_6 + 200 mg KCN ad 1000 ml Aqua bidest. .

3.1.2. Trägermaterial

Eine 25 mm² große Stoffprobe aus Baumwolle wurde eluiert. In dem für die Berechnungen entscheidenden Meßbereich von 540 bis 500 nm war keine Extinktion festzustellen. Das bedeutet, daß der Stoff bei Einwirkung dieses Elutionsmittels keine Eigenreaktion aufweist und daher als Träger von Blutspuren den Blutbefund im oben genannten Meßbereich nicht beeinflusst.

3.1.3. Bestimmung des geeigneten Verfahrens

Mit zwei 2 Jahre alten Blutproben (Nr. 20 und 24) wurde die von KLEIHAUER angegebene Methode so genau wie möglich nachgearbeitet. Da keine Zentrifuge mit 6000 U_{pm} zur Verfügung stand, wurde mit 5000 U_{pm} zentrifugiert,

was ohne Bedeutung sein dürfte. Bei drei weiteren der 2 Jahre alten Proben (Nr. 18, 23, 26) wurde die vorgeschriebene Elutionsdauer von 2 auf 9.5 Stunden verlängert, sie wurden "über Nacht" eluiert. Bei zwei anderen Proben (Nr. 17 und 78), die eine ebenfalls 2, die andere fast 3 Jahre alt, wurde statt eines 0,1 ml großen Fleckens ein Areal von 25 mm^2 nach der Originalmethode eluiert und ausgewertet. Durch diese Auswahl sollte ein Überblick über günstige Versuchsbedingungen gewonnen werden.

Von den oben angegebenen Proben wurden neben den von KLEIHAUER angegebenen Quotienten (Q_1 , zehnfache Verdünnung) zusätzlich die Quotienten der mit Transformationslösung versetzten Eluate (Q_2 , zweifache Verdünnung) und die Quotienten der unverdünnten Eluate (Q_3) bestimmt. Es war festzustellen, daß sich durch eine längere Elutionsdauer eine gewisse Steigerung der Eluatkonzentration erreichen läßt, ablesbar am Transmissionswert bei 540 nm. Bei allen Hauptversuchen wurde deshalb die Elutionsdauer verlängert.

Außerdem zeigte sich, daß die extrahierte Menge eines älteren 25 mm^2 großen Nativblutfleckens vergleichbar der Menge eines gleichalten 0,1 ml Citratblutfleckens ist. Der Grund dafür ist die größere Blutmenge pro Flächeneinheit eines Nativblutfleckens im Vergleich zu Citratblutflecken (vgl. dazu Abschnitt 2.2.2.). Die um etwa dreiviertel Jahre ältere Blutprobe (Nr. 78) zeigt keinen wesentlichen Unterschied gegenüber den jüngeren Proben.

Bei der Berechnung der Quotienten ergibt sich folgendes: durch die geringe Differenz der für Q_1 abgelesenen Werte am

Spektrophotometer (Tab. 7), die auf die niedrige Konzentration bzw. große Verdünnung zurückzuführen ist, kann schon durch kleine Ablesefehler eine größere Abweichung des Quotientenwertes entstehen, als bei den für Q_2 und Q_3 abgelesenen Werten im mittleren Bereich. So zeigt der Q_1 -Wert der Probe Nr. 23 eine deutlich größere Abweichung von den übrigen Werten als die Quotienten Q_2 und Q_3 im Vergleich zu den benachbarten Werten (siehe Tab. 7 und Abb. 9). Wäre dieser Wert in der Routine verwendet worden, wäre die Blutprobe für jünger gehalten worden, als sie wirklich ist. Die Transmissionswerte wurden in Extinktionswerte umgerechnet.

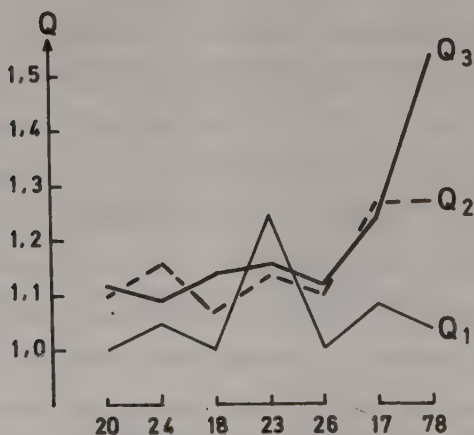


Abb. 9. Vergleich der Quotienten bei verschiedenen Verdünnungsstufen. Technik nach KLEIHAUER

Tab. 7. Vergleich der Quotienten bei verschiedenen Verdünnungsstufen. Technik nach KLEIHAUER

	Probe	540	500	Q	Alter/Tage
Q ₁	20	95,0	95,0	1,0	805
	24	90,5	91,0	1,049	805
	18	95,5	95,5	1,0	805
	23	97,5	98,0	1,246	805
	26	95,5	95,5	1,0	774
	17	96,2	96,5	1,082	805
	78	94,8	95,0	1,038	1020
Q ₂	20	88,0	89,0	1,099	
	24	84,0	86,0	1,158	
	18	82,5	83,5	1,069	
	23	91,0	92,0	1,137	
	26	89,0	90,0	1,10	
	17	95,0	96,0	1,264	
	78	85,0	88,0	1,270	
Q ₃	20	65,0	68,0	1,117	
	24	49,0	52,0	1,090	
	18	64,0	67,0	1,114	
	23	69,5	73,0	1,158	
	26	65,0	68,0	1,117	
	17	71,0	76,0	1,249	
	78	56,5	69,0	1,538	

Da die Quotienten der unverdünnten Eluate im gleichen Bereich wie die Werte der Quotienten nach Verdünnung liegen und so außerdem Verdünnungsfehler vermieden werden, erscheint es sinnvoll, die Eluate selbst spektrophotometrisch zu analysieren. In einem weiteren Versuch wurden deshalb zwei verschiedene Techniken miteinander verglichen:

- a) eine der Originalmethode entsprechende Technik (dabei wurden allerdings statt der Flecken, die mit der Blutmenge von 0,1 ml hergestellt wurden und in der rechtsmedizinischen Praxis nicht vorkommen, 25 mm² große Flecken verwendet),
 b) eine Technik, bei der auf Ausschütteln mit Tetrachlorkohlenstoff und Zentrifugieren sowie Herstellen einer Verdünnung verzichtet wurde.

Zwölf verschieden alte Blutproben wurden untersucht, wobei jeweils ein 25 mm² Flecken in 0,8 ml Transformationslösung über Nacht eluiert und dann, mit weiteren 0,8 ml versetzt, nach 30 min bestimmt wurde. Der andere 25 mm² große Flecken derselben Blutprobe wurde ebenfalls in 0,8 ml Transformationslösung über Nacht eluiert, es wurden 0,8 ml Transformationslösung hinzugegeben, und nach 30 min wurde mit 0,5 ml Tetrachlorkohlenstoff für 4 min ausgeschüttelt. Anschließend wurde für 10 min bei 5000 Upm zentrifugiert. Die Ergebnisse zeigen Tabelle 8 und Abbildung 10 und 11.

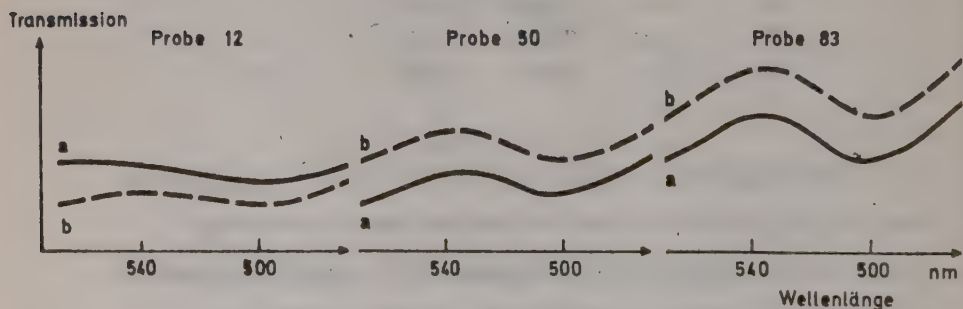
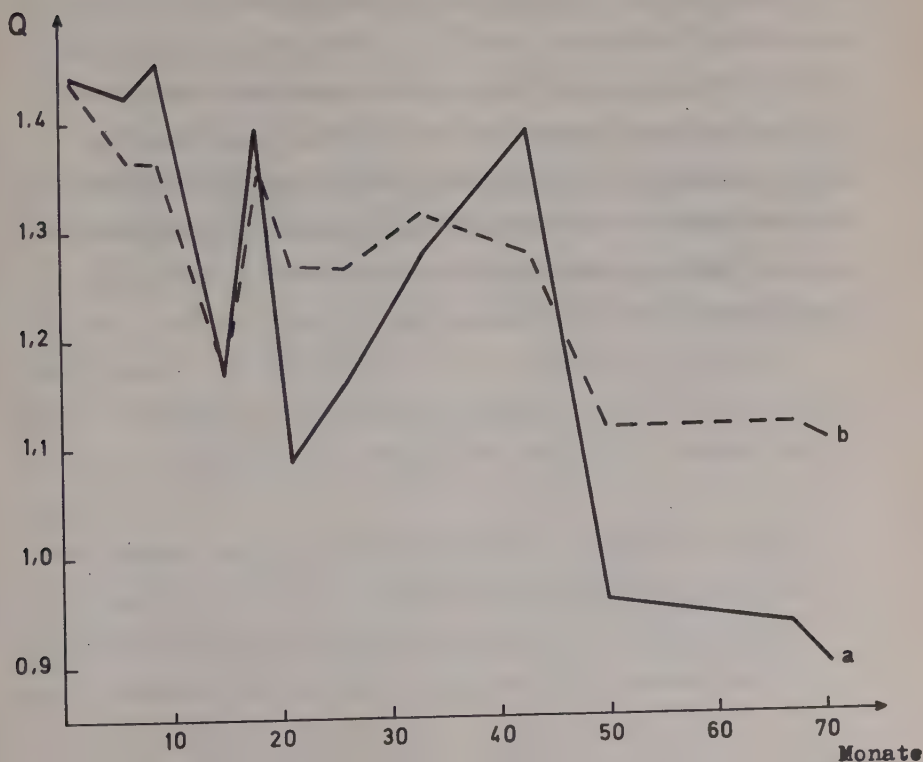


Abb. 10. Drei der mit zwei verschiedenen Techniken untersuchten Blutproben (vgl. Tab. 8). Technik nach FLEIHAUER

Tab. 8. und Abb. 11. Mit zwei verschiedenen Techniken
behandelte Blutproben.
Technik nach KLEIHAUER

Probe	Q_a	Q_b	Alter/ Monate
1	0,882	1,099	71,4
8	0,933	1,117	67,0
12	0,957	1,115	50,7
79	1,392	1,277	43,5
78	1,278	1,314	33,4
20	1,158	1,264	26,3
50	1,089	1,266	21,4
65	1,395	1,361	18,8
82	1,167	1,173	15,0
81	1,456	1,363	9,7
83	1,425	1,366	6,6
84	1,444	1,438	1,2



Wie in Abbildung 10 und 11 dargestellt, ergeben sich gewisse Konzentrationsunterschiede (Transmissionswert bei 540 nm) bei der Anwendung der beiden Verfahren, aber die Kurvenform und die Quotienten entsprechen sich. In der hier angelegten Versuchsreihe zeigen die ausgeschüttelten und nach dem Zentrifugieren verdünnten Eluate sogar größere Schwankungen der Quotienten als die nicht auf diese Weise behandelten Proben. Das liegt wahrscheinlich daran, daß die Verdünnung zusätzliche Fehler begünstigt. Aus diesem Grund wurde in den weiteren Versuchen auf das Ausschütteln, Zentrifugieren und Verdünnen verzichtet. Die Eluate wurden direkt der Spektralanalyse unterworfen. Außerdem wurde die Elutionsdauer wesentlich verlängert, und es wurde statt der Ausgangsmenge des Blutes (0,1 ml-Flecken) eine Flächeneinheit der Blutprobe (25 mm^2) als Bezugsstandard verwendet, wodurch ebenfalls gute Ergebnisse zu erreichen waren, wie bereits in diesem Abschnitt beschrieben (diese Flecken-größe hatte sich auch bei den Versuchen nach KIND bewährt). Außerdem konnten die Methoden von KIND und KLEIHAUER bei gleicher Aufbereitung des Untersuchungsmaterials besser miteinander verglichen werden.

3.2. Hauptversuche

Die Blutflecken wurden bei dem Verfahren nach KLEIHAUER ebenso wie bei dem Verfahren nach KIND in verschlossenen Coombs-Röhrchen in 1,55 ml Lösungsmittel über Nacht eluiert. Die Mindestdauer der Elution betrug 13.5 Stunden. Die 3 und 5 Jahre alten Blutproben wurden anschließend für mindestens 3 Stunden im Wärmeschrank unter zeitweiligem Rühren und Schütteln inkubiert.

3.2.1. Blutkonzentrationsänderungen im Eluat

3.2.1.1. Bei Doppelbestimmungen

Um zu kontrollieren, inwieweit der Quotient jeweils einer Blutprobe bei Doppelbestimmungen reproduzierbar ist und in welchen Grenzen er dabei schwankt, wurden mit 10 Blutproben (Alter 0-5 Tage) 50 Untersuchungen angestellt, wobei von jedem Flecken jeweils zwei 25 mm^2 große Proben analysiert wurden. Zugleich wurde ermittelt, welche Berechnungsart für die Quotienten zu besseren Ergebnissen führt: Auswertung der Transmissionswerte oder der Extinktionswerte (bei Verwendung der Extinktionswerte muß umgerechnet werden).

Die Auswertung der Extinktionswerte ergibt die günstigeren Ergebnisse (Tab. 9): die durchschnittliche Differenz der Doppelbestimmungen -in Prozent der Quotienten angeben- schwankt bei der Extinktion um 1,1%, während sich

bei der Transmission ein Wert von 2,3% ergibt. Auch der Schwankungsbereich der Absolutwerte, in dem die durchschnittlichen Differenzen abweichen, ist bei der Berechnung der Extinktionswerte günstiger.

Die Kurve der Quotienten bei der Alterung ist bei beiden Auswertungsarten sehr ähnlich, die Kurve der Transmissionswerte zeigt allerdings trotz der niedrigeren Absolutwerte der Quotienten eine stärkere Abnahme als die Kurve der Extinktionswerte. Außerdem wird deutlich, daß die mittlere Schwankungsbreite der Differenz $\bar{D}$ größer ist als die durchschnittliche tägliche Abnahme des Quotienten $\bar{Q}$, so daß eine genaue Altersbestimmung nicht möglich ist.

Tab. 9. Doppelbestimmungen mit Transmissions- und Extinktionswerten. Technik nach FLEIHAUER

Alter/ Tage	Extinktion			Transmission		
	$\bar{Q}$	$\bar{D}$	$\bar{D}\%$	$\bar{Q}$	$\bar{D}$	$\bar{D}\%$
0	1,5930	0,0201	1,306	1,3022	0,0296	2,273
1	1,5451	0,0227	1,469	1,3139	0,0286	2,176
2	1,5274	0,0169	1,106	1,2865	0,0322	2,502
3	1,5285	0,0121	0,791	1,2890	0,0344	2,668
4	1,5155	0,0178	1,174	1,2738	0,0220	1,727
5	1,5144	0,0124	0,818	1,2764	0,0316	2,475

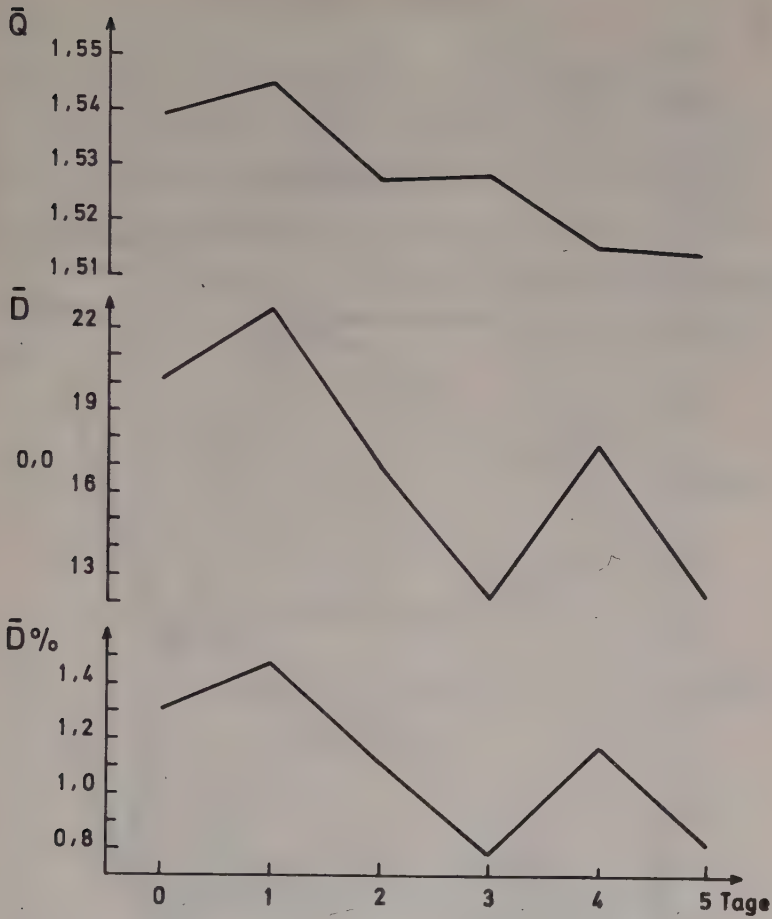


Abb. 12. Auswertung der Extinktionswerte
Technik nach KLEIHAUER

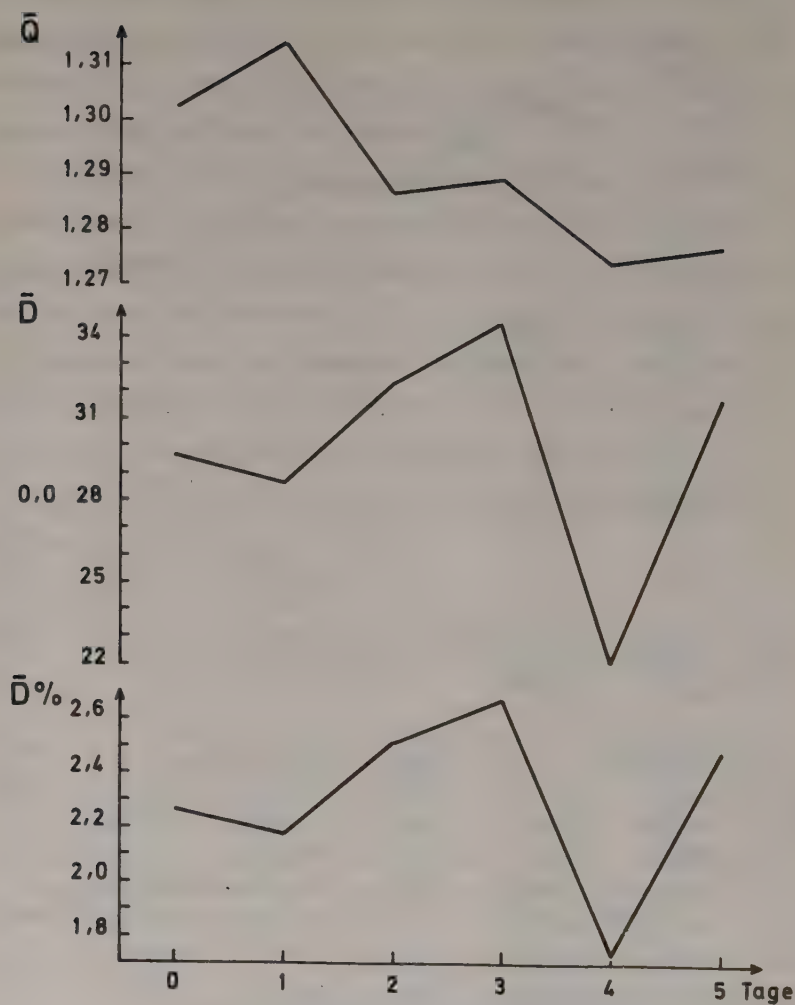


Abb. 13. Auswertung der Transmissionswerte
Technik nach KLEIHAUER

3.2.1.2. Durch Verdünnung

Es wurden drei Blutproben unterschiedlichen Alters (11 Tage, 39 Tage, 153 Tage) untersucht, indem jeweils ein stark konzentriertes Eluat hergestellt und dieses in willkürlichen Verdünnungsstufen gemessen wurde (Abb. 14, die Kurven sind in Bezug auf die Ordinate zum besseren Vergleich willkürlich, aber im gleichen Maßstab untereinander gezeichnet).

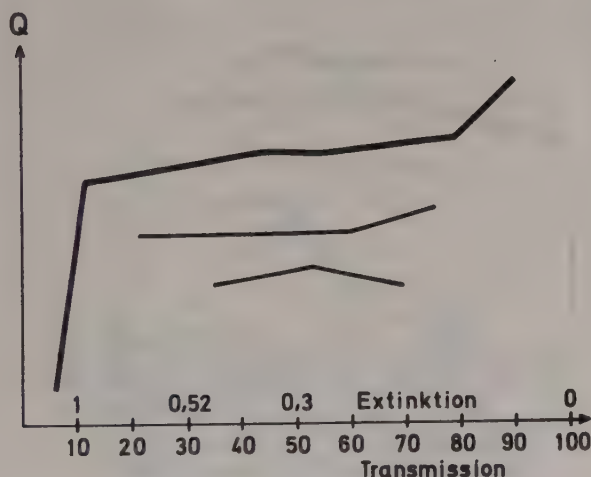


Abb. 14. Quotient in Abhängigkeit vom Verdünnungsgrad des Eluates. Technik nach KLEIHAUER

3.2.1.3. Durch Änderung der Probengröße

Es wurde an 5 Blutproben unterschiedlichen Alters (4 Tage, 39 Tage, 153 Tage, 1002 Tage) geprüft, ob die Quotienten von der Probengröße abhängig sind. Die kleinste Probengröße war $6,25 \text{ mm}^2$, die anderen Größen waren vielfache davon bis maximal 100 mm^2 (Abb. 15).

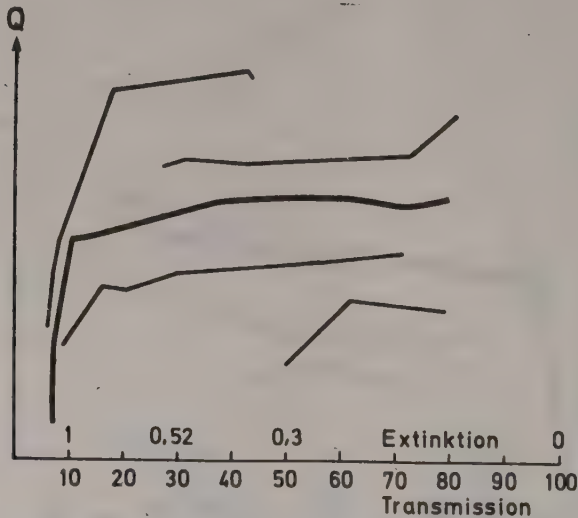


Abb. 15. Quotienten in Abhängigkeit von der Probengröße
Technik nach KLEINHAUER

Beim Vergleich zwischen Verdünnung der Eluate und Änderung der Probengröße zeigt sich, wie zu erwarten, kein Unterschied. Aus den beiden Abbildungen 14 und 15 ergibt sich, daß der Quotient im Bereich von 20% bis 80% Transmission ziemlich konstant ist (es sei noch einmal

daran erinnert, daß die in den Transmissionskurven abgelesenen Werte in Extinktionswerte umgerechnet wurden), während er unter 20% und über 80% deutlich abweicht. Dies läßt sich auch beim Betrachten der vom Spektrophotometer aufgezeichneten Kurven erkennen (Abb. 16).

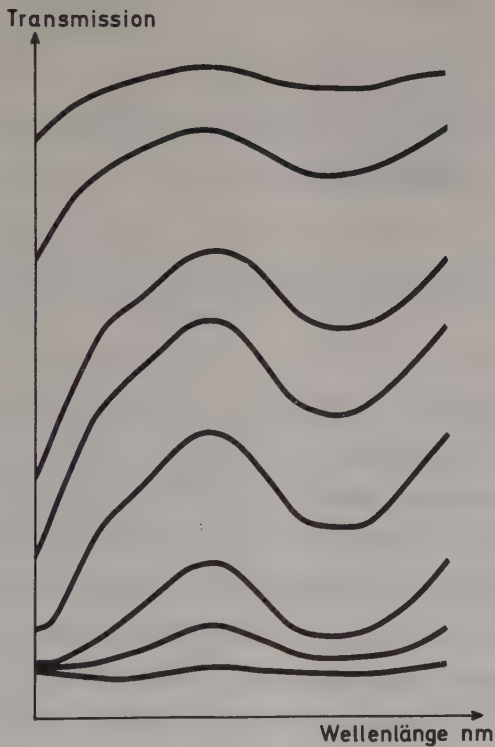


Abb. 16. Kurven einer Blutprobe, deren Eluat in verschiedenen Konzentrationsstufen untersucht wurde. Technik nach FLEIHAUER

Im Bereich unter 20% und über 80% steht dem Gerät kein ausreichend großer Meßbereich mehr zur Verfügung, um ein deutliches Kurvenprofil zeigen zu können. Hierdurch und durch mögliche Ablesefehler, die gerade bei geringen Differenzen zwischen Maxima und Minima einer Kurve einen großen Einfluß haben, werden Abweichungen der Quotientenwerte bewirkt. Zusätzlich werden die Werte bei der Berechnung der Quotienten an Hand der Extinktionswerte besonders im Meßbereich unter 10% Transmission verfälscht, weil hier eine große Änderung der entsprechenden Extinktionswerte stattfindet (logarithmischer Wert), so daß geringste Ablesefehler zu starken Abweichungen führen können. Die Differenz zwischen kleinstem und größtem Quotientenwert, bezogen auf den Mittelwert aus allen Kurven einer Probe, beträgt (in Abhängigkeit von der Konzentration) bis zu 40%. Auch hier wurde noch einmal der Unterschied zwischen Extinktions- und Transmissionswerten bestimmt. Die Berechnung der Transmissionswerte ergibt etwas stärkere Abweichung. Noch wichtiger aber ist, daß die Quotientenwerte keinen mittleren Bereich mit einigermaßen konstanten Werten zwischen 20% und 80% zeigen, sondern daß im Gegensatz zur Extinktion mit abnehmender Konzentration der Wert des Quotienten ansteigt (Abb. 17, Kurve 1 entspricht der in Abb. 14 stärker gezeichneten Kurve, Kurve 2 der in Abb. 15 hervorgehobenen Kurve).

Wie sich im Verlauf der oben dargestellten Versuche zeigt, nimmt mit steigender Konzentration des Eluates die Höhe des Maximums bei 540 nm zu, d.h. die Transmission

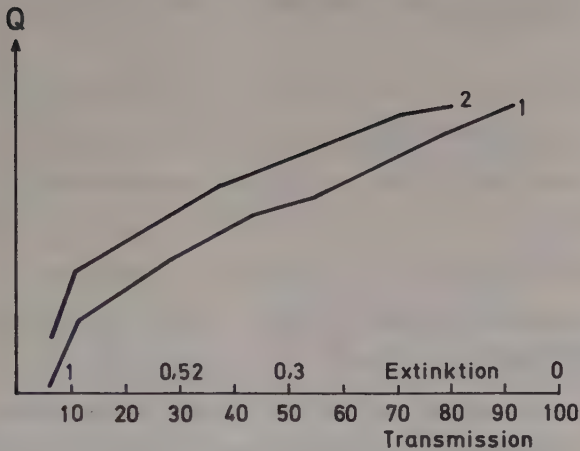


Abb. 17. Quotient in Abhängigkeit von der Konzentration, Berechnung anhand der Transmissionswerte. Technik nach KLEIHAUER

wird geringer und die Extinktion entsprechend größer. Die Höhe des Minimums läßt sich zur Konzentrationskontrolle nicht verwenden, denn, wie KLEIHAUER sagt, ändert sich der Wert des Minimums altersabhängig. Die Transmission (Extinktion) bei 500 nm (Minimum) wird also sowohl vom Alter als auch von der Konzentration beeinflusst. Aber nicht nur der Wert des Minimums, sondern auch der errechnete Quotient ist dadurch von der Konzentration abhängig. Also hat neben dem Alter auch die Blutmenge einen Einfluß auf den Quotienten, die pro Flächeneinheit des Trägermaterials eluiert wird. Dabei ergeben sich einigermaßen konstante Werte, wenn die Quotienten mit Hilfe der Extinktionswerte des mittleren Bereiches (am Spektrophotometer sowie am Schreiber zwischen 20% und 80% Transmission abzulesen) errechnet werden.

3.2.2. Vergleich zwischen Nativ- und Citratblut

Es wurden aus dem oben unter 2.2.2. angegebenen Grund Nativblutproben mit Citratproben desselben Spenders verglichen. Dabei zeigte sich, daß die Konzentration der Nativblutextrakte größer als die der Citratblutextrakte ist (3 Abweichungen bei 27 Versuchen), erkennbar an der Höhe des Transmissionswertes bei 540 nm. Dies stimmt überein mit den Ergebnissen bei den nach FIND untersuchten Proben. Zur Erklärung und zum Vergleich siehe Abschnitt 2.2.2. . Es ist festzustellen, daß die Werte der Citratblutflecken unter den Werten der Nativblutproben liegen (Tab. 10 und Abb. 18).

Tab. 10. Vergleich zwischen Nativ- (N) und Citratblutflecken (C). Technik nach FLEIHAUER

Alter	91		94		95	
Probe	N	C	N	C	N	C
45	1,424	1,428	1,410	1,420	1,385	1,381
46	1,424	1,428	1,434	1,430	1,395	1,377
47	1,432	1,419	1,446	1,412	1,413	1,375
48	1,447	1,391	1,451	1,388	1,429	1,377
49	1,424	1,406	1,442	1,423	1,395	1,325
50	1,408	1,404	1,430	1,367	1,364	1,345
	1,427	1,413	1,435	1,406	1,396	1,363

Alter	135		138		139	
Probe	N	C	N	C	N	C
41	1,452	1,435	1,444	1,513	1,405	1,367
42	1,443	1,430	1,440	1,482	1,423	1,392
43	1,506	1,491	1,433	1,455	1,373	1,342
	1,467	1,452	1,439	1,483	1,400	1,367

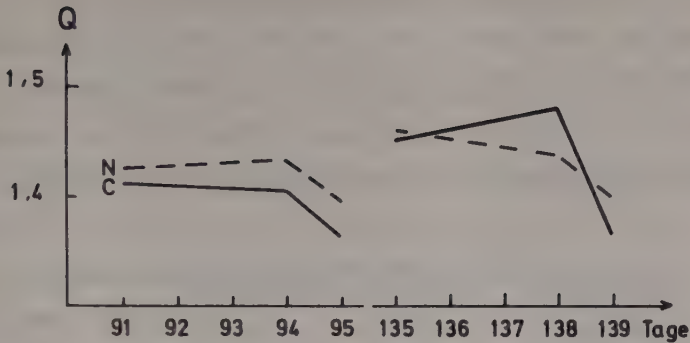


Abb. 18. Vergleich zwischen Nativ- und Citratblutflecken.
Technik nach KLEIHAUER

Die Kurven der Citratblutflecken sind zwar von der Form her durchaus mit denen der Nativblutflecken vergleichbar, aber die Werte müssen getrennt betrachtet werden, denn eine Citratprobe -im Rahmen von Nativproben bewertet- würde wegen des geringeren Quotienten ein höheres Alter vortäuschen und damit zu falschen Schlüssen Anlaß geben. Daß der Quotient der 138 Tage alten Citratproben so hoch liegt, mag daran liegen, daß zwei der zur Mittelwertberechnung herangezogenen Quotienten von Kurven stammen, die jenseits des günstigen Bereiches von 20% bis 80% liegen und damit sehr hoch ausfallen. Weiter ist festzustellen, daß Blutproben verschiedener Serien (ungleiche Umwelteinflüsse, z.B. durch die Jahreszeit bedingte Schwankungen der Temperatur und des Lichtes) nicht ohne weiteres verglichen werden können, in Abb. 18 fallen die Werte der älteren Proben (135/138/139 Tage) von einem höheren Niveau aus ab als die der jüngeren

Proben (91/94/95 Tage). Im Rahmen der allgemeinen Altersbestimmungen wurde auch eine Citratblutprobe mituntersucht. Die errechneten Werte wurden Quotienten gegenübergestellt, die von zur gleichen Zeit mitanalysierten Nativblutproben derselben Serie erhalten worden waren (Tab. 11 und Abb. 19).

Tab. 11. Vergleich der Blutalterung bei Nativ- und Citratblut. Technik nach KLEIHAUER

Alter/Tage	7	13	14	21
Citrat	1,516	1,530	1,468	1,481
Nativ	1,497	1,522	1,500	1,481

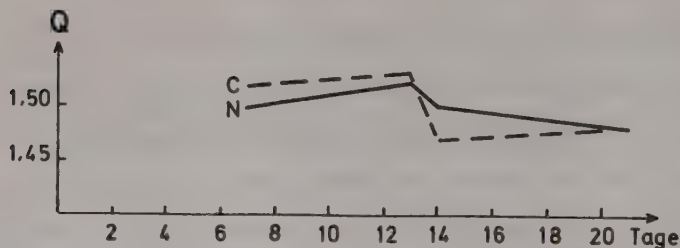


Abb. 19. Vergleich der Blutalterung bei Nativ- und Citratblut. Technik nach KLEIHAUER

Die Citratprobe hat in Bezug auf die Größenordnung gleiche Werte wie die Nativproben, die aber weder im Verhältnis zueinander noch beim Altersprozeß eine eindeutige Tendenz erkennen lassen. Nur bei der Auswertung der Spektrophotometerkurven zeigte sich, daß die Konzentration der Citratblutextrakte etwas geringer ist als die der Nativblutflecken (zur Erklärung vgl. Abschnitt 2.2.2.).

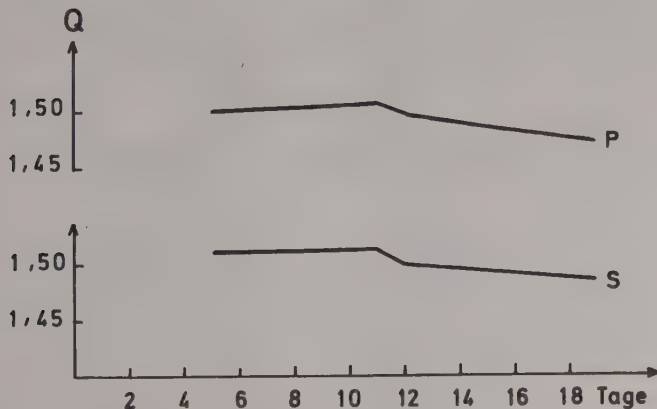
3.2.3. Einfluß des Trägermaterials

3.2.3.1. Vergleich von Baumwollstoff mit Fließpapier

Blut desselben Spenders wurde beim Herstellen der Blutflecken auf verschiedene Trägermaterialien aufgebracht, und die Flecken wurden im Verlauf der Altersuntersuchungen miteinander verglichen. Da das Fließpapier saugfähiger als der untersuchte Baumwollstoff ist, liegt die Konzentration der Eluate gleichgroßer Blutflecken höher als die der Baumwollstoffflecken (entsprechend niedrigerer Transmissionswert oder höherer Extinktionswert bei 540 nm). die Ergebnisse zeigen Tabelle 12 und Abbildung 20.

Tab. 12 und Abb. 20. Vergleich der Quotienten von Blutflecken auf Stoff und Papier. Technik nach FLEIHAUER

Alter/Tage	5	11	12	19
Stoff	1,513	1,513	1,499	1,485
Papier	1,501	1,509	1,499	1,476



Beide Kurven haben eine sehr ähnliche Form, die Quotienten unterscheiden sich nur geringfügig, und hinsichtlich der Alterung ist kein wesentlicher Unterschied erkennbar.

3.2.3.2. Vergleich zwischen Baumwollstoff und "Nyltest"

Bei diesem Vergleich läßt sich kein deutlicher Konzentrationsunterschied feststellen. Die altersbedingte Abnahme des Quotienten ist bei dem Baumwollstoff eindeutiger als bei "Nyltest", die Werte liegen bei "Nyltest" geringfügig höher (Tab. 13 und Abb. 21).

Tab. 13. Vergleich von Baumwollstoff mit "Nyltest"
Technik nach KLEIHAUER

Alter/Tage	Stoff	Nyltest
0	1,547	1,582
1	1,532	1,544
2	1,517	1,532
3	1,549	1,537
4	1,537	1,556
5	1,520	1,533
7	1,507	1,499
11	1,488	1,517

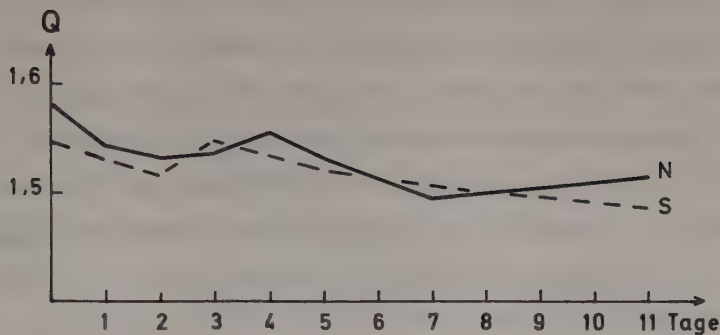


Abb. 21. Vergleich der Quotienten von Blutflecken auf Baumwollstoff und "Nyltest". Technik nach KLEIHAUER

3.2.3.3. Vergleich verschiedener Stoffarten

Von älteren Untersuchungen mit anderen Zielen lagen Spuren einer Nativblutprobe vor, die auf verschiedenen Stoffarten (Baumwolle, "Nyltest") aufgebracht worden waren. Auch hier wurde in einem Versuch geprüft, ob sich ein Unterschied ergibt (Tab. 14).

Tab. 14. Vergleich der Quotienten bei Blutflecken auf verschiedenen Stoffarten. Technik nach KLEIHAUER

Probe 8	Alter: 1476 Tage
Stoffart 1	1,246
Stoffart 2	1,291
Stoffart 3	1,278
"Nyltest"	1,445

Für die verschiedenen Trägermaterialien ergeben sich stark differierende Quotienten. Ob das auf das höhere Alter von über 4 Jahren, auf unterschiedliche Art der Aufbewahrung oder auf andere Ursachen zurückzuführen ist, läßt sich nicht ergründen. Zum mindesten kann man sagen, daß sich Blutspuren auf verschiedenen Trägern bei höherem Alter nicht ohne weiteres vergleichen lassen und damit keine sichere Aussage über das Blutalter gestatten.

3.2.4. Blutaltersbestimmung an allen untersuchten Blutproben

Die Ergebnisse von sämtlichen untersuchten Nativblutproben auf Baumwollstoff -also sowohl die von früheren Versuchen noch vorhandenen als auch die erst im Rahmen dieser Untersuchungen frisch angelegten Blutflecken - wurden in einer Tabelle und einem Diagramm zusammengefaßt. Auf die Berechnung statistischer Werte wurde verzichtet; es wurden nur zu jedem Quotientenmittelwert der jeweils höchste und niedrigste gemessene zugehörige Wert in der Kurve aufgezeichnet (vgl. Abschnitt 2.2.4.). Die Tabelle 15 und die dazu gehörende Abbildung 22 enthalten alle Quotientenwerte. (Bei Mehrfachbestimmung wurde der Mittelwert eingesetzt.) Der zugrundegelegte jeweils untersuchte Zeitabschnitt ist das Jahr -in der Abbildung logarithmisch dargestellt-, für die weniger als ein Jahr alten Proben wurden kleinere Zeitintervalle zusammengefaßt: beginnend mit der kleinsten verwendeten Zeiteinheit (Tage) wurde der

Mittelwert der zugehörigen Quotienten bestimmt, anschließend der Mittelwert der jeweils folgenden nächstgrößeren Zeiteinheit (Woche, Monat, 1/4 Jahr, 1/2 Jahr, 1 Jahr). Dies erwies sich sowohl von der zeitlichen Überschaubarkeit als auch von der Abnahme der Quotienten her als sinnvoll.

Bei weiteren Berechnungen wurden nur die Werte verwendet, die von einer Probengröße von 25 mm^2 stammten und in dem oben genannten mittleren Bereich lagen. Abbildung 23 zeigt die sich daraus ergebende Kurve. Im Gegensatz zu der Kurve in Abbildung 22 ist hier über den gesamten Bereich eine gleichmäßiger abnehmende Tendenz der Quotienten festzustellen, starke Schwankungen kommen nicht vor. Da aber durch diese Selektion der Quotienten einerseits die Anzahl der Werte im Rahmen dieser Berechnungen stark eingeschränkt wurde, und andererseits nur unter günstigen (und damit in der rechtsmedizinischen Praxis nicht allzu häufigen) Bedingungen auch aus älteren 25 mm^2 großen Blutproben Eluatkonzentrationen zu erhalten sind, die in dem günstigen Transmissionsbereich von 20% bis 80% liegen, wurden in einer weiteren Kurve (Abb. 24) auch die von größeren Proben stammenden Quotienten verwendet. Dabei ergibt sich eine Kurve, die der in Abbildung 22 sehr ähnlich ist, aber im Vergleich zu der Kurve in Abbildung 23 wieder deutliche Schwankungen aufweist.

In allen drei Kurven ist, besonders bei den älteren Blutproben, eine deutliche Abweichung der einzelnen Quotienten vom Mittelwert festzustellen, d.h. die Abweichungen der einzelnen Werte eines Zeitabschnittes sind

Tab. 15. Quotienten aller zur Blutaltersbestimmung
untersuchten Blutproben. Technik nach
KLEIHAUER

C	Tage						
	1	2	3	4	5	6	7
1,510	1,502	1,5425	1,5215	1,5165	1,499	1,497	1,491
1,523	1,5835	1,5145	1,534	1,5205	1,517	1,492	1,490
1,5135	1,5445	1,535	1,523	1,5105	1,513	1,505	1,492
1,501	1,562	1,526	1,511	1,5105	1,515	1,518	1,503
1,5175	1,534	1,5335	1,493	1,5195	1,524	1,503	1,512
1,5195	1,556	1,517	1,549	1,537	1,542	1,507	1,512
1,5475	1,5325	1,5205	1,5345	1,550	1,5125		1,496
1,581	1,542	1,5245	1,546	1,493	1,508		1,491
1,5565	1,5365	1,5205	1,5395	1,505	1,5165		1,517
1,559	1,530	1,5405	1,5335	1,501	1,5175		1,494
1,5715	1,530			1,479	1,5175		1,511
					1,520		1,507
					1,525		1,504
					1,529		1,515
					1,517		1,516
					1,540		1,507
1,536	1,541	1,527	1,5285	1,513	1,5195	1,504	1,5035

Wochen				Monate		
1	2	3		1	2	3
1,496	1,510	1,499	1,434	1,438	1,384	1,424
1,487	1,481	1,468	1,442	1,446	1,439	1,447
1,497	1,493	1,490	1,456	1,491	1,450	1,424
1,471	1,490	1,481	1,451		1,467	1,432
1,478	1,500	1,485	1,464		1,237	1,424
1,524	1,522	1,478			1,251	1,408
1,513	1,482	1,509			1,400	
1,484	1,488	1,463				
1,488	1,471	1,479				
1,508	1,467	1,481				
1,508	1,490	1,477				
1,503	1,481	1,502				
1,491	1,491	1,487				
1,488	1,500					
1,493		1,485	1,499	1,458	1,375	1,4265

Jahre				
1/4		1/2		
1,410	1,459	1,098	1,351	1,173
1,434	1,168	1,300	1,415	0,968
1,446	1,595	1,428	1,498	1,361
1,451	1,401	1,429	1,316	1,432
1,442	1,452	1,366	1,397	1,376
1,430	1,443	1,447	1,382	1,266
1,385	1,506	1,369	1,393	
1,395	1,444	1,442	1,363	
1,413	1,440	1,440	1,432	
1,429	1,433	1,376	1,070	
1,395	1,405	1,324	1,237	
1,364	1,423	1,426		
1,150	1,373			
1,275	1,457			
1,443				
1,409		1,361		1,263

Jahre			
2	3	4	5
1,264	1,277	1,097	1,117
1,185	1,376	1,217	0,936
1,151		1,115	1,099
1,164		0,968	0,983
1,225		1,171	
1,292		0,908	
1,254		1,108	
1,278		1,102	
1,314		1,063	
1,376		1,0185	
0,905		1,218	
0,994		0,942	
		0,914	
1,200	1,3265	1,065	1,034

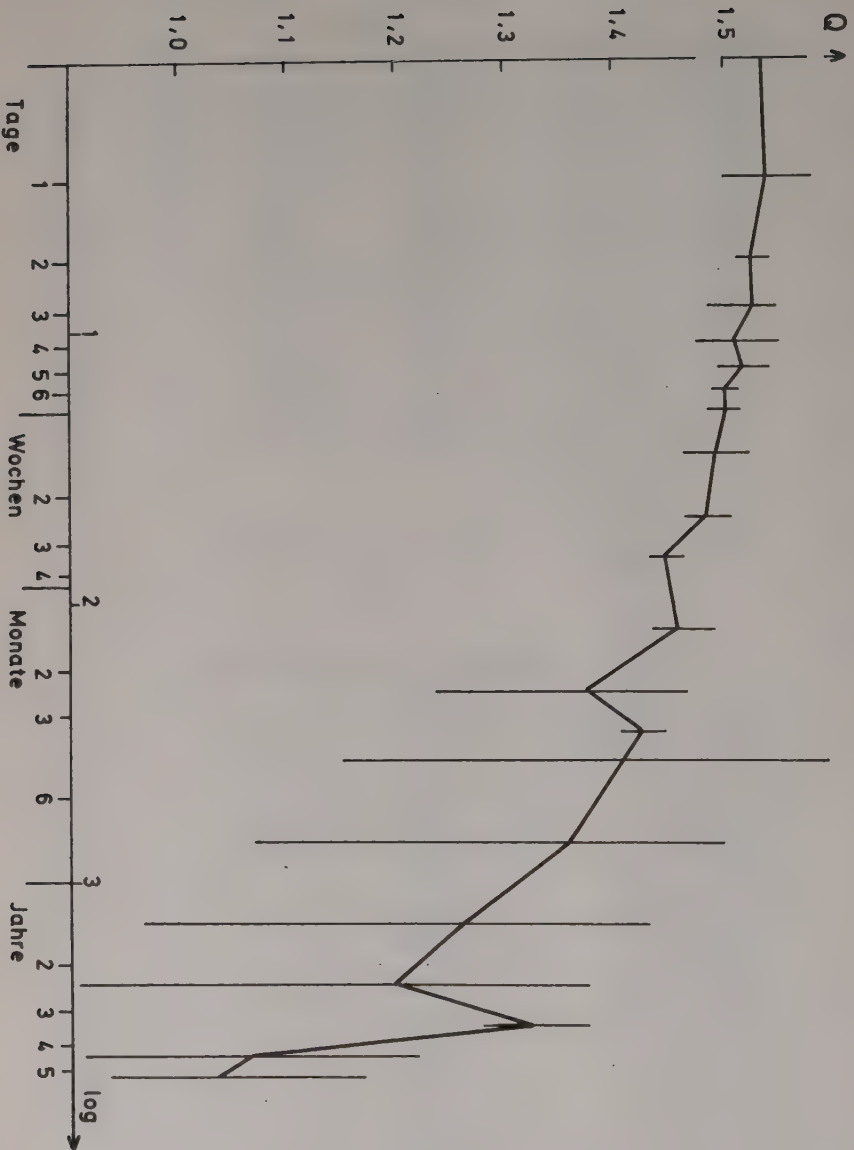


Abb. 22. Blutaltersbestimmung an allen untersuchten Blutproben. Technik nach KLEIHAUER.
Je Messpunkt sind auch die höchsten und niedrigsten Einzelmesswerte angegeben (senkrechte Linien).

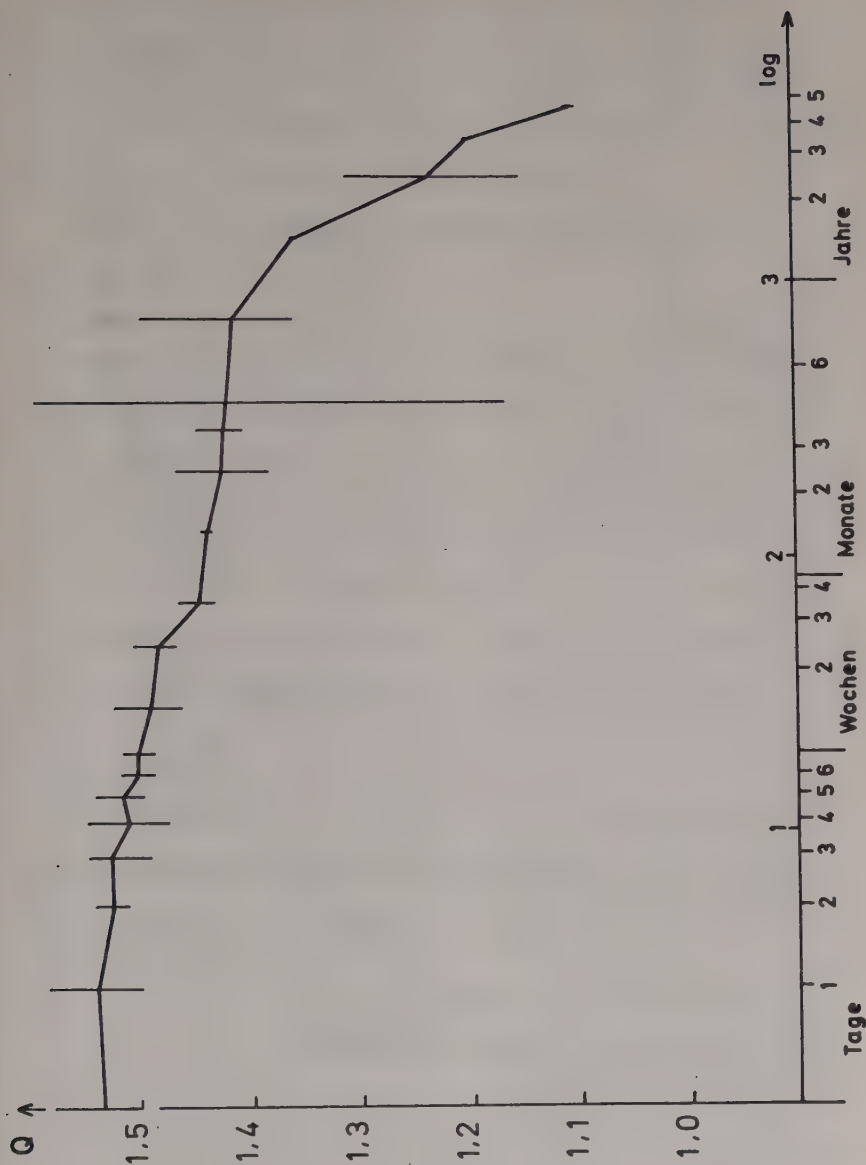


Abb. 23. Blutaltersbestimmung mittels Quotienten von 25 mm² großen Proben des Transmissionsbereiches 20% bis 80%. Technik nach KLEIHAUER

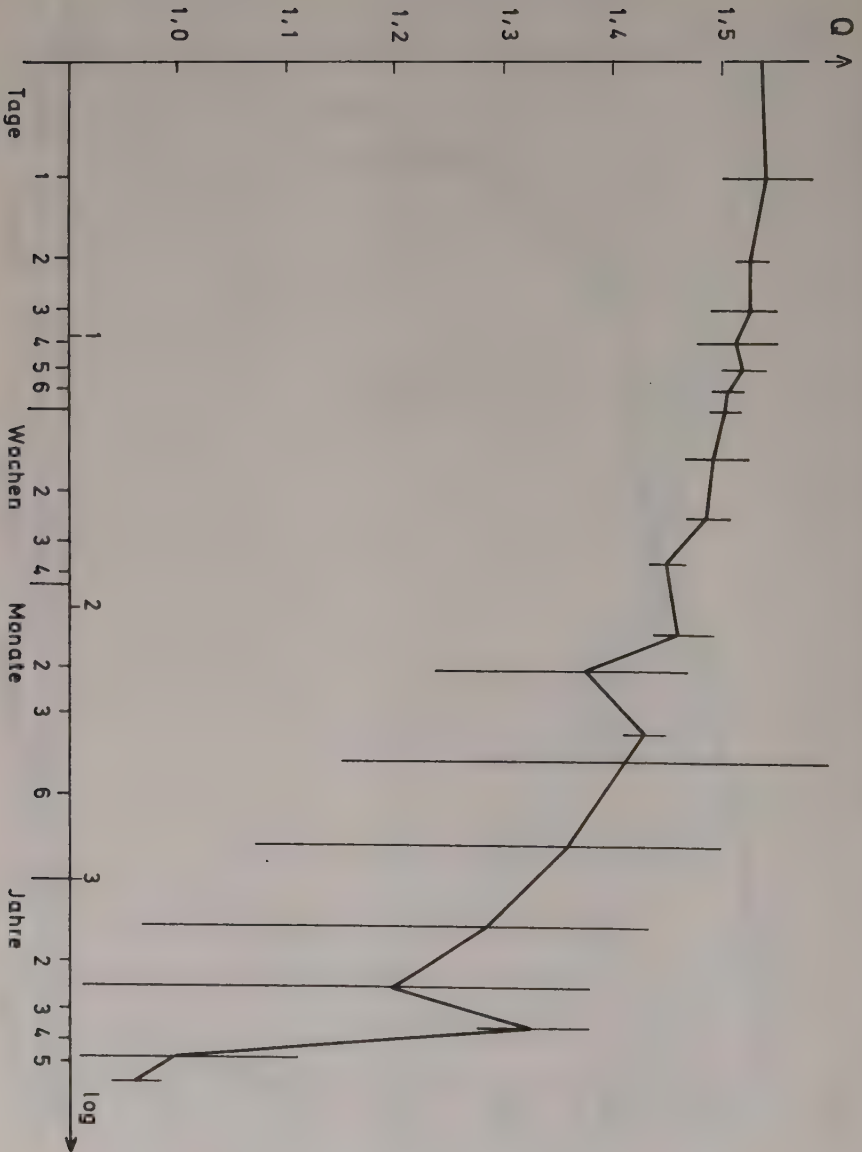


Abb. 24. Blutaltersbestimmung mittels Quotienten des Transmissionsbereiches 20% bis 80%.
Technik nach KLEIHAUER

größer als die entsprechende Abnahme des Quotienten pro Zeitabschnitt. Daher ist eine sichere Altersbestimmung mit der angewendeten Methode nicht möglich. Es wurde deshalb ein weiterer Versuch mit verbesserten Bedingungen unternommen, der im folgenden beschrieben wird.

Mit diesen verbesserten Versuchsbedingungen wurden folgende Ergebnisse erzielt:

Damit Konzentrationsschwankungen des Eluates den Quotienten nicht mehr beeinflussen können, wurden zwölf Blutproben im Alter von 1 bis 71 Monaten so untersucht, daß bei allen die Kurve des Spektrophotometers bei 540 nm (Maximum) einen Transmissionswert von 60% zeigte, d.h. die Konzentration der Eluate gleich war. An dieser Stelle sei daran erinnert, daß sich, wie bei KLEIHAUER beschrieben, nur das Minimum bei 500 nm altersabhängig ändert, während das Maximum bei 540 nm gleich bleibt. Bei der in Abbildung 25 gezeigten Kurve wurde aus zeichnerischen Gründen als Zeiteinheit der Monat gewählt.

Wider Erwarten zeigte die Kurve trotz verbesserter Versuchsbedingungen deutliche Schwankungen der Quotientenwerte, die eine sichere Altersbestimmung unmöglich erscheinen lassen.

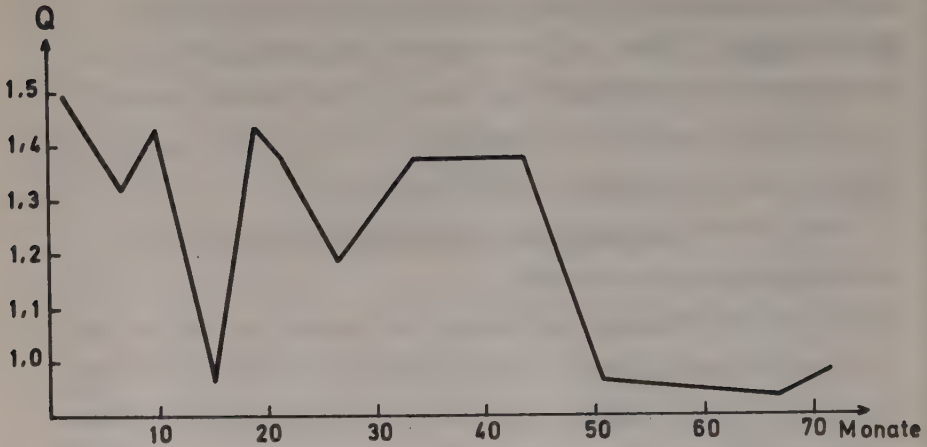


Abb. 25. Blutaltersbestimmung bei verbesserten Bedingungen (Eluate gleicher Konzentration). Technik nach KLEIHAUER

3.2.5. Blutaltersbestimmung einzelner Blutproben

Um auch die Blutalterung einzelner Blutproben verfolgen zu können, wurden bei 10 Proben in kürzeren Zeitabständen fortlaufend die Quotienten bestimmt (Tab. 16 und Abb. 26). Sowohl bei der einzelnen Blutprobe als auch bei der Mittelwertkurve sind deutliche Schwankungen der Quotienten im Laufe des Alterns festzustellen, wobei die Mittelwertkurve geringfügigere Abweichungen zeigt. Es ist zwar die eindeutig abnehmende Tendenz der Werte festzustellen, aber auch bei derselben untersuchten Probe sind die Schwankungen der Quotientenwerte für eine Blutaltersbestimmung in der rechtsmedizinischen Praxis zu groß.

Tab. 16. Blutaltersbestimmung einzelner Proben im Verlauf der Alterung. Technik nach KLEIHAUER

Alter	0	1	2	3	4	5
Probe						
67	1,510	1,4905				1,542
68	1,523	1,5835	1,5425	1,5215	1,5165	1,5125
69	1,5135	1,5445	1,5145	1,534	1,5205	1,508
70	1,501	1,562	1,535	1,523	1,5105	1,5165
71	1,5175	1,556	1,526	1,511	1,5105	1,5175
72	1,5195	1,534	1,5335	1,493	1,5195	1,5175
73	1,5475	1,5325	1,517	1,549	1,537	1,520
74	1,581	1,542	1,5205	1,546	1,550	1,525
75	1,5565	1,5365	1,5245	1,5395	1,493	1,529
76	1,559	1,530	1,5205	1,5335	1,505	1,517
77	1,5715	1,530	1,5405	1,5345	1,501	1,534
	1,536	1,540	1,5274	1,5285	1,516	1,521

Alter	6	7	9	11	13	Tage
Probe						
67	1,507				1,482	
68	1,497	1,496	1,496		1,488	
69	1,492	1,491	1,487		1,467	
70	1,505	1,517	1,497		1,471	
71	1,518	1,494	1,471		1,490	
72	1,503	1,511	1,478		1,481	
73		1,507		1,488		
74		1,504		1,508		
75		1,515		1,508		
76		1,516		1,503		
77		1,507		1,491		
	1,503	1,505	1,485	1,499	1,479	

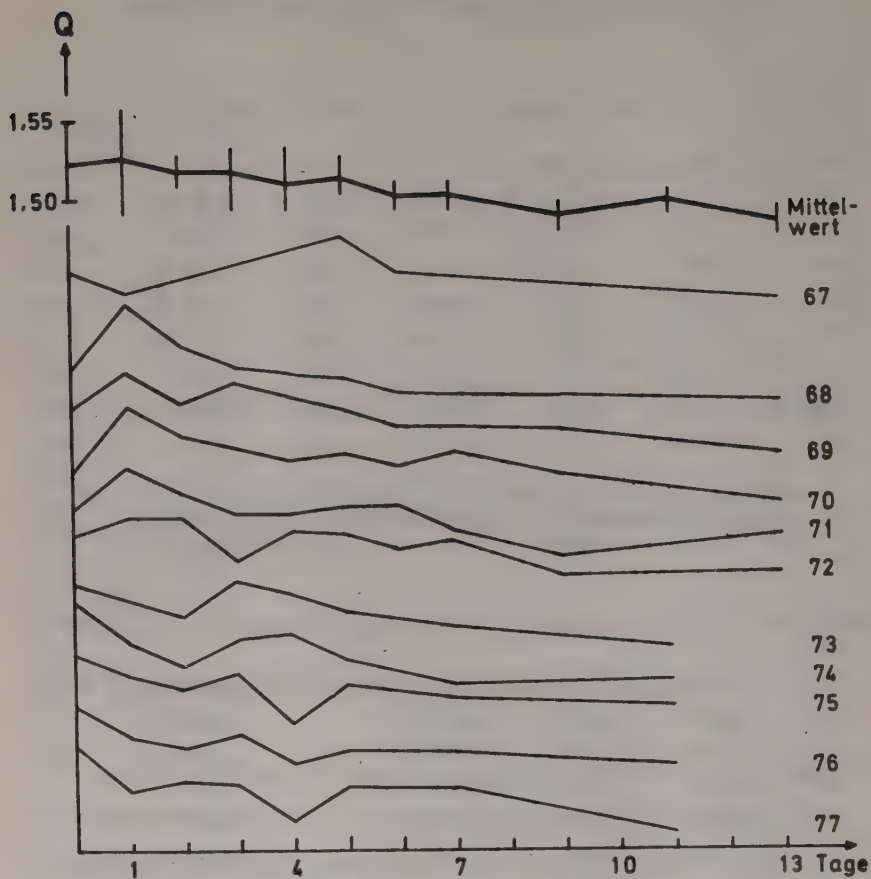


Abb. 26. Blutaltersbestimmung einzelner Proben im Verlauf der Alterung. Technik nach FLEIHAUER

C. Besprechung und Vergleich beider Methoden

Beide Methoden der Blutaltersbestimmung beruhen auf Änderungen der Extinktion (oder Transmission) bei bestimmten Wellenlängen, ausgedrückt in Form eines Quotienten. Da sich mit verschiedenen Konzentrationen der Blutextraktionen auch der Wert der Extinktion (Transmission) ändert, sind damit bei beiden Methoden auch Änderungen der Quotienten verbunden. Der Quotient ist also nicht nur vom Alter abhängig, sondern, neben anderen Faktoren, insbesondere von der Konzentration des Eluates. KIND versuchte, mit der Konstruktion einer Hilfsgeraden die Konzentration zu vernachlässigen. Auch bei der in dieser Arbeit verwendeten Modifikation seiner Methode, die Quotienten mit Hilfe der Transmissionswerte zu berechnen, ließ sich ein günstiger mittlerer Bereich von 10% bis 80% Transmission mit einigermaßen konstanten Werten ermitteln. Trotzdem war aber der Schwankungsbereich noch zu groß, um eine sichere Blutaltersbestimmung zu ermöglichen.

Das Verfahren von KLEIHAUER erwies sich als völlig konzentrationsabhängig. KLEIHAUER umging dieses Problem, indem er einerseits konstante Blutvolumina (von 0,1 ml Blut hergestellte Flecken) eluierte, was allerdings in der rechtsmedizinischen Praxis nicht möglich ist, andererseits wurden die Blutflecken nur bis zum Alter von 15 Wochen untersucht, bei denen die in höherem Alter verminderte Eluierbarkeit noch keinen Einfluß hat. Wenn in der rechtsmedizinischen Praxis vergleichbare Werte erreicht werden sollen, müssen Blutproben von konstanter Flächeneinheit

eluiert werden, was auch KIND berücksichtigt hatte (Proben-
größe: 25 mm²).

Bei beiden Verfahren erwiesen sich aber schon die Blutkonzentrationsschwankungen pro Flächeneinheit des Trägermaterials desselben untersuchten Fleckens -ermittelt durch mehrfache Doppelbestimmungen- als so groß, daß eine sichere Altersbestimmung nicht möglich war. Aus diesem Grund wurde versucht, die Methode dadurch zu verbessern, daß nicht mit konstanter Fleckengröße, sondern mit konstanter Konzentration des Eluates gearbeitet wurde. (Bei alten Blutproben sind dabei allerdings wesentlich größere Blutflecken nötig, die in der Praxis nicht immer zur Verfügung stehen.) Dies war bei dem Verfahren nach KLEIHAUER gut möglich, indem der Transmissionswert bei 540 nm (Maximum) stets auf den gleichen Wert eingestellt wurde. Aber auch bei diesen verbesserten Versuchsbedingungen waren keine geeigneten Ergebnisse zu erhalten. Nicht erwiesene andere Faktoren beeinflussen die Quotienten zu stark. Bei dem Verfahren nach KIND war eine solche Konzentrationseinstellung nicht möglich, denn hierbei findet nicht nur eine Abnahme der Extinktionswerte (oder Zunahme der Transmissionswerte) mit zunehmendem Alter statt, sondern gleichzeitig eine Verschiebung des Kurvenprofils zu anderen Wellenlängen.

Eine weitere Möglichkeit, eine Verbesserung der Ergebnisse zu erreichen, wäre theoretisch dadurch zu erlangen, daß von einer unbekannten Blutprobe mehrere Untersuchungen zum gleichen Zeitpunkt gemacht würden und der entsprechende Mittelwert bestimmt würde und anschließend während der

folgenden Alterung aus der Tendenz weiterer Quotienten auf das Blutalter geschlossen würde. Dies würde aber wesentlich größere Mengen an Probenmaterial erfordern, abgesehen von dem Aufwand an Zeit und Arbeit. Die Methode erfährt dadurch eine starke Einschränkung hinsichtlich ihrer Eignung in der Praxis.

Die Ergebnisse beider Verfahren sind demnach neben anderen Faktoren sowohl vom Alter als auch von der Konzentration des Eluates abhängig, wobei im Einzelfall nicht festgestellt werden kann, auf welchen der Faktoren Änderungen des Quotienten zurückzuführen sind. Die altersbedingte abnehmende Tendenz der Quotientenwerte ist zwar bei beiden Verfahren nachzuweisen, die Sicherheit der exakten Blutaltersbestimmung ist aber unter allen erprobten Voraussetzungen für Untersuchungen in Strafprozessen nicht ausreichend.

D. Zusammenfassung

Aufgabe dieser Arbeit war es, in Anlehnung an von KIND und WATSON (1973) sowie KLEIHAUER und Mitarbeitern (1967) veröffentlichte Verfahren eine für die rechtsmedizinische Praxis geeignete Methode zur Blutaltersbestimmung zu finden. In beiden Verfahren werden die altersbedingten Änderungen der Blutflecken spektralanalytisch gemessen, indem ein Quotient aus den bei 2 Wellenlängen aus den Spektrophotometerkurven abgelesenen Werten gebildet wird. Mit Hilfe von 85 untersuchten Blutproben wurde in über 900 Versuchen neben der Blutaltersbestimmung ermittelt, inwieweit das Trägermaterial oder die Verwendung von Citrat- statt Nativblut einen Einfluß auf diese Quotienten haben. Bei allen Versuchen zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Quotientenwerte von der Konzentration des Eluates. Es war zwar eine altersbedingte abnehmende Tendenz der Werte zu erkennen, aber der Schwankungsbereich war zu groß, um eine sichere Altersbestimmung zu ermöglichen. Beide Verfahren sind deshalb für die Blutaltersbestimmung ungeeignet.

E. Literatur

- KIND, S. and R. CLEEVELY: The Use of Ammoniacal Bloodstain Extracts in ABO Groupings. J. Forens. Sci. Soc., 9, 131-134, 1969
- KIND, S., D. PATTERSON and G. OWEN: Estimation of the Age of Dried Blood Stains by a Spectrophotometric Method. Forens. Sci., 1, 27-54, 1972
- KIND, S. and M. WATSON: The Estimation of Blood Stain Age from the Spectrophotometric Properties of Ammoniacal Blood Stain Extracts. Forens. Sci., 2, 325-332, 1973
- KLEIHAUER, E., G. STEIN und G. SCHMIDT: Beitrag zur Altersbestimmung von Blutflecken. Arch. Kriminol., 140, 84-94,[†] 1967
- SCHLEYER, F.: Photometrische Mengenbestimmung ange-trockneter Blutspuren aus ihrem Hämoglobin-gehalt, bestimmt als Cyanhämoglobin. Blut, 17, 20-24, 1968
- Schwarzacher, W.: Altersbestimmung von Blutspuren. Z. gerichtl. Med., 15, 119-124, 1930
- Weinig, E.: Eine Methode zur Altersbestimmung von Blut- und Spermaflecken. Z. gerichtl. Med., 43, 1-10, 1954

Herrn Professor Dr. F. Schleyer danke ich für die
Überlassung des Themas.

Frau Professor Dr. I. Oepen bin ich für ihre
Anregungen und Beratung und ihre wertvolle Unterstützung
bei den Versuchen und der Ausarbeitung der Dissertation
zu großem Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 9. Januar 1951 wurde ich als Sohn des Diplom-Kaufmanns Erich Köhler und seiner Ehefrau Ursula, geb. Viehweger in Lohfelden bei Kassel geboren. Nach einem Umzug nach Kassel-Wilhelmshöhe trat ich dort 1957 für vier Jahre in die "Volksschule am Heideweg" ein. Von 1961 bis 1969 besuchte ich das Gymnasium "Wilhelmsschule Kassel", in dem ich im mathematisch-naturwissenschaftlichen Zweig die Reifeprüfung ablegte.

Im Oktober 1969 nahm ich das Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg auf, in dessen Verlauf ich im Oktober 1970 das Vorphysikum und im März 1972 das Physikum bestand. Am 18. Juli 1975 beendete ich das medizinische Staatsexamen in Marburg.

Im Januar 1976 habe ich meine erste Medizinalassistentenstelle in der Universitäts-Augenklinik angetreten.

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren
und Dozenten:

Arndt, Aurich, Bommer, Buchholz, Daume, Dehnicke,
Dieterich, Dimroth, Dittrich, Dölle, Eißner, Eschenbach,
Exner, Friedrich, Ganz, Graul, Hamelmann, Hardewig,
Hensel, Hering, Heß, Hildebrandt, Hilgermann, Hort,
Jacob, Kaffarnik, Karlson, Klaus, Klein, Kleinsasser,
Koch, Koecke, Koransky, Lauer, Linneweh, Lütcke,
Mannheim, Maroske, Martini, Nesswetha, Oepen, I., Petry,
Pots, Reim, Remschmidt, Rodeck, Rohen, Schleyer, Schmid,
Schmitz-Moormann, Schultheis, Seidel, Siegert, Uhlarik,
Walcher, Wehrmeyer, Willenbockel.

